

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem
Institut für Virologie

Evaluation von Methoden zur Verbesserung der CD8⁺ T-Zell-Immunantwort im
murinen Friend Retrovirus-Modell

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Philipp Roman Gödel
aus Koblenz

2013

- Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. U. Dittmer
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. K. Lang
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. H. Schaal, Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2014

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Publikation veröffentlicht worden:

Gödel, P.; Windmann, S.; Dietze, K. K.; Dittmer, U.; Bayer, W. (2012):
Modification of One Epitope-Flanking Amino Acid Allows for the Induction of
Friend Retrovirus-Specific CD8⁺ T Cells by Adenovirus-Based Immunization.
Journal of Virology 86, 12422–12425.

Inhalt

1	Einleitung	6
1.1	Retroviren.....	6
1.1.1	Aufbau und Genom	7
1.1.2	Infektion und Replikationszyklus	8
1.1.3	Das Humane Immundefizienzvirus	9
1.1.4	Antivirale Immunantwort und retrovirale Immunevasions- strategien	13
1.2	Tiermodelle retroviraler Infektionen	17
1.3	Antiretrovirale Vakzinierungsstrategien.....	18
1.4	Verbesserung des Immunsierungserfolgs	22
1.5	Adenovirale Vektoren	22
1.6	Das Friend Virus	23
1.7	Zielsetzung	26
2	Material	27
2.1	Geräte.....	27
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	28
2.3	Chemikalien	28
2.4	Enzyme	29
2.5	Reagenzsysteme.....	30
2.6	Puffer und Lösungen	30
2.7	Medien	32
2.8	Plasmide.....	33
2.9	Oligonukleotide	33
2.10	Standards.....	34
2.11	Peptide.....	34
2.12	Antikörper und Tetramere.....	35
2.13	Bakterien und Zelllinien.....	36

2.14	Viren.....	37
2.15	Versuchstiere	37
3	Methoden	38
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	38
3.1.1	PCR.....	38
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.1.3	TA-Klonierung.....	40
3.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.1.5	Transformation von Bakterien.....	40
3.1.6	Plasmid-Isolation, DNA-Restriktion und DNA-Fällung	41
3.1.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	41
3.2	Zytologische Methoden.....	42
3.2.1	Kultivierung von Zelllinien	42
3.2.2	Bestimmung von Zellzahlen.....	42
3.2.3	DNA-Transfektion von Zellen	42
3.2.4	Aufreinigung von Adenoviren	43
3.2.5	Titerbestimmung.....	43
3.3	Immunologische Methoden	44
3.3.1	Vakzinierung und Belastungsinfektion.....	44
3.3.2	Milzpalpation, Entnahme von Blut und Milzzellen	45
3.3.3	<i>In vitro</i> -Proliferationsassay.....	46
3.3.4	Bestimmung der Viruslast	46
3.3.5	Bestimmung der zellulären Immunantwort	48
4	Ergebnisse	50
4.1	Herstellung rekombinanter Impfvektoren.....	50
4.2	Evaluation F-MuLV Pol-kodierender Impfvektoren	52
4.3	Verbesserung der Epitopprozessierung durch Modifikation der Gag-Sequenz	55

4.4	Einfluss einer Zytokin-Koexpression auf den Impferfolg	58
5	Diskussion	64
6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis	73
8	Anhang	87
8.1	Abkürzungsverzeichnis	87
8.2	Abbildungsverzeichnis	90
8.3	Tabellenverzeichnis	90
8.4	Danksagung	91
8.5	Lebenslauf	92

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Am Anfang des 20. Jahrhunderts gelang Peyton Rous mit der Entdeckung des nach ihm benannten Geflügelsarkomvirus die erste Beschreibung eines Retrovirus (Rous, P., 1910). Doch erst fast 60 Jahre später – im Jahr 1970 – konnten Howard Temin (Temin, H. M.; Mizutani, S., 1970) und David Baltimore (Baltimore, D., 1970) unabhängig voneinander das Enzym identifizieren, welches diese Virusspezies von allen anderen bekannten unterscheidet: die *Reverse Transkriptase*.

Weiter an Bedeutung gewannen Retroviren am Anfang der 1980er Jahre, als mit dem humanen T-lymphotropen Virus (HTLV-1) zum ersten Mal Retroviren mit menschlichen Erkrankungen in eine kausale Verbindung gebracht werden konnten (Poiesz, B. J. et al., 1981). HTLV-1 ist für etwa 20 Millionen Infektionen in den Endemiegebieten (Japan, Karibik, Südamerika, Zentralafrika) verantwortlich und führt in einem geringen Prozentsatz zur adulten T-Zell Leukämie, der Tropischen Spastischen Paraparese und weiteren Erkrankungen (Gonçalves, D. U. et al., 2010). Von herausragender Bedeutung ist jedoch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), welches von der Arbeitsgruppe um Luc Montagnier im Jahr 1984 entdeckt und durch Robert Gallo et al. als Ursache von AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) identifiziert werden konnte (Vahlne, A., 2009). Aufgrund der pandemischen Verbreitung und therapeutischen Herausforderungen ist HIV zu einem der bedeutendsten Infektionserreger des 21. Jahrhunderts geworden.

Anhand morphologischer, genetischer sowie infektions- und krankheitstypischer Merkmale werden Retroviren in sieben Genera unterteilt: α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren sowie *Lenti*- und *Spumaviren*. Darüber hinaus kann zwischen endogenen und exogenen Retroviren unterschieden werden. Endogene Retroviren haben sich im Laufe der Evolution ubiquitär in das Genom aller Wirbeltierspezies integriert und werden so über die Keimzellbahn vertikal übertragen. Humane endogene Retroviren (HERV) machen etwa 8 Prozent, unter Einbeziehung aller Fragmente und Derivate sogar bis zu 50 Prozent des menschl-

chen Genoms aus. In den letzten Jahren wurden viele HERV mit diversen physiologischen und pathophysiologischen Phänomenen in Verbindung gebracht (Ryan, F. P., 2004). Exogene Retroviren durchlaufen dagegen einen vollständigen Infektions- und Replikationszyklus. Im weiteren Verlauf wird mit dem Begriff Retroviren auf exogene Retroviren Bezug genommen.

1.1.1 **Aufbau und Genom**

Retroviren sind umhüllte RNA-Viren, deren Genom einzelsträngig in doppelter Ausführung und mit Nukleokapsidproteinen komplexiert im Kapsid enthalten ist. Die Hüllmembran (*Envelope*) leitet sich von derjenigen der Wirtszelle ab und ist von viralen Glykoproteinen durchsetzt. Von besonderer Bedeutung sind das transmembrane und das externe *Envelope*-Glykoprotein, welche nichtkovalent miteinander verbunden sind. Letztgenanntes ist für die Adsorption der Viruspartikel an die Wirtszellmembran verantwortlich und weist bei HIV eine hohe genetische Variabilität auf, was unter anderem auf den hohen antikörperbedingten Selektionsdruck zurückzuführen ist. Das Virusinnere enthält neben dem Kapsid auch Matrixproteine sowie die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease.

Retroviren weisen ein 7 - 12 kb großes RNA-Genom auf, das sich in 3 wesentliche Sequenzbereiche gliedert, welche wiederum die folgenden Genprodukte kodieren:

- Gag (*Group-specific Antigen*): Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine
- Pol (*Polymerase*): virale Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease)
- Env (*Envelope*): Glykoproteine der Hüllmembran

Diese kodierenden Sequenzen werden von regulatorischen flankiert. Ein Teil dieser Kontrollsequenzen sind die LTR-Regionen (*Long Terminal Repeats*), welche die Genexpression des Provirus kontrollieren und mit denen unter anderem Zelltyp-spezifische Transkriptionsaktivatoren interagieren. Hinzu kommen bei komplexen Retroviren (Lenti- und Spumaviren, δ -Retroviren) weitere regulatorische und akzessorische Gene (Modrow, S. et al., 2003).

1.1.2 Infektion und Replikationszyklus

Bestimmte Domänen der externen Glykoproteine vermitteln die retrovirale Adsorption an spezifische Rezeptormoleküle der Zielzellen (s. Abb. 1.1). Durch Umlagerung des transmembranen Proteins kommt es zur Membranfusion und der Aufnahme des Virusinhalts in die Wirtszelle. Nach dem *Uncoating* (Degradation des Kapsids) beginnt das Umschreiben der retroviralen RNA in DNA durch die *Reverse Transkriptase*. Durch die fehlende *Proof-Reading*-Fähigkeit (Korrekturlesefunktion) der Reversen Transkriptase werden mit einer vergleichsweise hohen Wahrscheinlichkeit falsche Basenpaare synthetisiert, was einen Grund für die hohe Mutationsfrequenz von Retroviren darstellt.

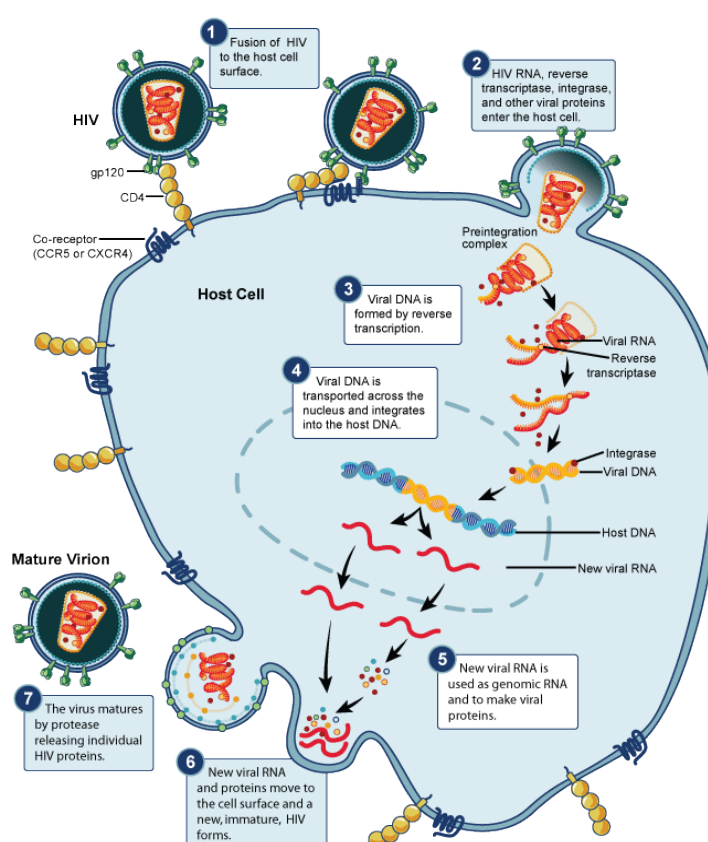


Abb. 1.1: Infektions- und Replikationszyklus von HIV

Vermittelt durch die gp120/CD4-Interaktion (1) kommt es zur Fusion des Viruspartikels mit der Wirtszelle (2). Nach der reversen Transkription der Virus-RNA (3) wird die synthetisierte virale DNA durch die Integrase in das Wirtszellgenom eingefügt, das Provirus entsteht (4). Nach Transkription proviraler DNA entstehen nach Spleißvorgängen virale Proteine und Enzyme sowie die ungespleißte Virus-RNA (5). Im Zuge von Reifungsprozessen und Verpackungen von Virusproteinen und RNA (6) kommt es nach der Abkapselung zur Formierung neuer Viruspartikel (7) (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2012).

Der synthetisierte DNA-Doppelstrang kann nur bei Lentiviren direkt in den Kern transportiert werden, alle anderen Retroviren können ihre DNA nur während der Mitose in das Wirtszellgenom integrieren. Ein weiteres retrovirales Enzym, die *Integrase*, schneidet das zelluläre Genom an einer virustypischen Region und katalysiert das Einfügen des retroviralen DNA-Doppelstrangs. Das durch die Integration entstandene sogenannte *Provirus* verhält sich von nun an wie ein zelluläres Gen. Nach der Transkription proviraler DNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II entstehen in der Folge RNA-Sequenzen, die nach Spleißvorgängen in strukturelle und regulatorische Proteine sowie Enzyme translatiert werden. Die so synthetisierten viralen Glykoproteine lassen sich auf der Membran infizierter Zellen nachweisen und ermöglichen auch eine Zell-Zell-Transmission von Retroviren. Ungespleißte RNA-Einzelstränge enthalten hingegen das gesamte Virusgenom. Die abermals fehlende *Proof-Reading*-Funktion der zellulären Polymerase ist für einen weiteren Anteil der Mutationen im retroviralen Genom verantwortlich, sodass bei HIV jedes neu produzierte Virion durchschnittlich mindestens ein falsch eingebautes Nukleotid aufweist. Abschließend werden das retrovirale Genom und die Strukturproteine sowie virale Enzyme verpackt, schnüren sich in Vesikeln ab und formen so neue infektiöse Viruspartikel. Die Wirtszelle geht letztlich durch Apoptose zugrunde (Modrow, S. et al., 2003). Der komplette Infektionszyklus bis zur Neuinfektion weiterer Zellen nimmt etwa 2 Tage in Anspruch (Coffin, J. M. et al., 1997).

1.1.3 Das Humane Immundefizienzvirus

Im Juni 1981 publizierte das US-amerikanische Center for Disease Control and Prevention (CDC) einen Bericht über fünf homosexuelle Männer, die an der bis dato sehr seltenen *Pneumocystis-Pneumonie* erkrankt waren. Dies waren die ersten Berichte über ein Phänomen, welches als *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS; erworbenes Immundefektsyndrom) in die Geschichte eingehen sollte. Bald darauf wurden weitere Fälle opportunistischer Infektionen und des ebenfalls seltenen *Kaposi-Sarkoms* bekannt (Cock, K. M. de et al., 2011). Erst drei Jahre später wurde der Beweis erbracht, dass das humane Immundefizienz-Virus (HIV) die Ursache für AIDS ist (Vahlne, A., 2009).

HIV ist eine virale Zoonose: Man geht davon aus, dass HIV-Typ 1 (HIV-1) in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts im Südosten Kameruns die Spezies-

grenze überschritt und sich aus *SIVcpz*, einem Immundefizienz-Virus der Schimpansen (*P. t. troglodytes*) entwickelte (Keele, B. F. et al., 2006). HIV-1 wird in die drei Subtypen N (*New*), O (*Outlier*) und M (*Main*) eingeteilt, wobei HIV-1/M für den Großteil der Pandemie verantwortlich ist und weiter in die Genotypen (*Clades*) A bis I untergliedert wird (der Genotyp B kommt in Europa und den USA am häufigsten vor) (Modrow, S. et al., 2003). Diese Einteilung erfolgt aufgrund von Sequenzunterschieden, welche vermutlich auf drei eigenständige Interspeziesübertragungen zurückzuführen sind (Keele, B. F. et al., 2006). Das weniger virulente HIV-2 ist hingegen hauptsächlich endemisch auf dem afrikanischen Kontinent verbreitet und leitet sich von SIVsmm ab, dem Virus einer Mangabenart der Elfenbeinküste (Santiago, M. L. et al., 2005). Inzwischen weisen jedoch auch europäische Länder mit sozioökonomischen Verbindungen zu den afrikanischen Endemiegebieten – wie Portugal und Frankreich – eine erhöhte HIV-2-Prävalenz auf (Valadas, E. et al., 2009). In den letzten 30 Jahren entwickelte sich aus diesen HIV-Ausbrüchen eine der verheerendsten Pandemien in der Geschichte der Menschheit, welche bis heute etwa 30 Millionen Todesopfer forderte. Ende 2010 waren weltweit etwa 34 Millionen Menschen mit HIV infiziert (s. Abb. 1.2).

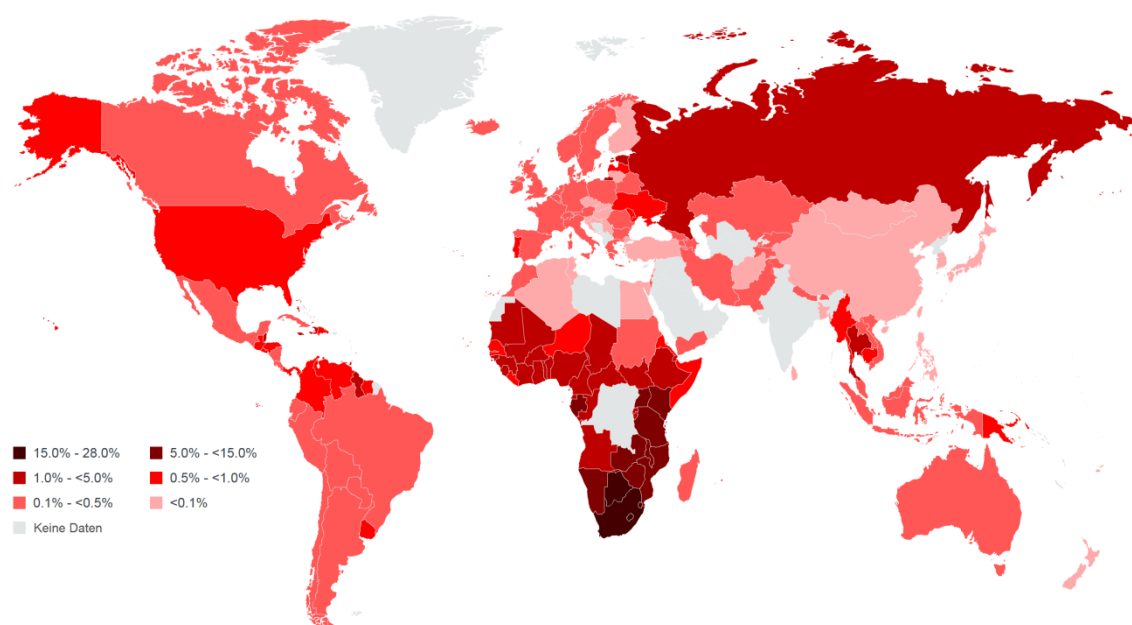


Abb. 1.2: Globale HIV-Prävalenz 2011

Insbesondere Länder niedrigen bis mittleren Einkommens sind von der HIV-Pandemie betroffen (modifiziert nach: UNAIDS, 2012a).

Diese hohe Zahl reflektiert zum einen die immer noch hohe Neuinfektionsrate (2,5 Millionen Neuinfektionen im Jahr 2011, seit 1997 fallend), zum anderen aber auch den weltweit deutlich verbesserten Zugang zu antiretroviraler Therapie; Etwa acht Millionen Menschen erhalten antiretrovirale Medikamente und so nimmt die Rate an Todesfällen durch AIDS stetig ab. Doch trotz dieser Erfolge steht die Welt vor enormen Herausforderungen: Ungeachtet aller Bemühungen steigen die Neuinfektionsraten in einigen Ländern Osteuropas und Asiens (UNAIDS, 2012b). AIDS ist trotz intensiver Forschung nicht heilbar, unter anderem stellen infizierte ruhende Gedächtnis-T-Zellen ein virales Reservoir dar, das weder den herkömmlichen Medikamenten, noch der antiviralen Immunantwort zugänglich ist (Margolis, D. M., 2010). Mit dem verbesserten Zugang zu retroviralen Medikamenten nimmt auch die Gefahr der Entstehung therapieresistenter HIV-Stämme zu, 10-20 % aller neuinfizierten Personen in Regionen mit breitem Zugang zu antiretroviraler Therapie weisen eine oder mehrere Resistenzen gegenüber entsprechenden Medikamenten auf (Simon, V. et al., 2006; Wensing, A. M. J. et al., 2005). Die Kosten für eine universelle Prävention und Therapie von HIV und AIDS werden auf über 25 Milliarden US-Dollar pro Jahr geschätzt. Die Mehrzahl aller Länder niedrigen und mittleren Einkommens sind daher abhängig von Auslandsinvestitionen und können dennoch nur knapp 54 % aller Infizierten die nötige Medikation zur Verfügung stellen (UNAIDS, 2012b). Vielen dieser Probleme könnte mit der Entwicklung eines effektiven Impfstoffes begegnet werden. Doch seit der Entdeckung von HIV konnte keine der klinisch am Menschen getesteten Vakzinierungsstrategien einen ausreichenden Schutz gewährleisten.

HIV-1 zählt als Lentivirus zu den komplexen Retroviren, dessen 9,8 kb großes Genom neben den Sequenzen Gag, Pol und Env auch solche für regulatorische und akzessorische Proteine (Rev, Tat bzw. Nef, Vif, Vpr, Vpu) aufweist. Von besonderer Bedeutung sowohl für den viralen Infektionszyklus wie auch die antiretrovirale Immunabwehr sind die durch Env-Gene kodierten Glykoproteine gp41 und gp120. Ersteres bildet als Transmembranprotein über nicht-kovalente Bindungen mit gp120 einen Komplex, der letztlich für die Inkorporation des Virus verantwortlich ist. Rev und Tat fungieren als (post-)transkriptionelle Transaktivatoren, sie führen also zu einer gesteigerten Gen-

expression. Die akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr, Vpu sind nicht essenziell, aber bedeutsam für die Infektiosität von HIV (Modrow, S. et al., 2003).

HIV kann über nahezu alle Körperflüssigkeiten übertragen werden. Die Hauptinfektionsquellen sind jedoch Sperma und Vaginalflüssigkeit, Blut (Bluttransfusionen, intravenöser Drogenabusus) und Muttermilch.

Während der frühen Akutphase der Infektion werden dendritische Zellen und Makrophagen der Darm- und Genitalschleimhäute infiziert. HIV bindet über gp120 an den CD4-Rezeptor. Eine Konformationsänderung im gp120-Molekül erlaubt die Bindung an Korezeptoren, bei HIV vor allem die Chemokinrezeptoren CCR5 bzw. CXCR4. Von den meisten Virusisolaten wird CCR5 als Korezeptor in der Frühphase der Infektion genutzt. Im späteren Verlauf kann es zu einem Umschalten auf CXCR4 kommen, welcher vor allem zur Infektion von T-Zellen genutzt wird und oft mit einem rapiden Krankheitsprogress aufgrund einer massiven Depletion dieser Zellen verbunden ist (Gorry, P. R.; Ancuta, P., 2011; Simon, V. et al., 2006). Nach der akuten, oft unbemerkt verlaufenden Infektion schließt sich eine symptomfreie Latenzphase von 6 Monaten bis über 20 Jahren an, in welcher sich die Abtötung und Neubildung von CD4⁺ Lymphozyten die Waage halten. Schließlich kommt es zu einer Erschöpfung der Kompensationsmechanismen und die symptomatische Phase beginnt, welche letztlich zu AIDS und ohne Therapie zum Tod durch opportunistische Infektionen oder Malignome führt (Simon, V. et al., 2006).

Heute geht man davon aus, dass die durch HIV induzierte Aktivierung des Immunsystems einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese von AIDS hat (Sousa, A. E. et al., 2002; Hazenberg, M. D. et al., 2003). Wie genau sich diese Aktivierung schädigend auf die Immunabwehr auswirkt, ist bisher Gegenstand verschiedener Theorien (Sodora, D. L.; Silvestri, G., 2008).

Nicht alle HIV-Infizierte entwickeln jedoch dieses progrediente Krankheitsbild: Sogenannte *Longterm Non-Progressors*, d.h. HIV-infizierte ohne Krankheitsprogression über Jahre, und eine heterogene Gruppe hochexponierter, dauerhaft seronegativer Personen, verfügen über verschiedene Mechanismen, die Infektion zu kontrollieren oder gar zu vermeiden. Diese Erkenntnisse ermöglichen wertvolle Rückschlüsse für die Entwicklung immunotherapeutischer anti-

retroviraler Strategien, insbesondere für Vakzinierungen (Simon, V. et al., 2006; Poropatich, K.; Sullivan, D. J., 2011).

1.1.4 **Antivirale Immunantwort und retrovirale Immunevasionsstrategien**

Die Hauptakteure der Immunreaktionen gegen retrovirale Infektionen sind die T-Lymphozyten der adaptiven Immunabwehr und durch B-Zellen gebildete neutralisierende Antikörper. Darüber hinaus sind Faktoren wie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) des angeborenen Immunsystems, der HLA-Genotyp und intrinsische, intrazelluläre antiretrovirale Mechanismen von Bedeutung.

Viele Erkenntnisse zur antiretroviralen Immunantwort stammen aus der Erforschung von Infektionsverläufen HIV-Infizierter sowie aus retroviralen Tiermodellen von SIV und murinen Leukämieviren. Insbesondere das *Friend Murine Leukemia Virus* (Friend Virus, FV) hat wertvolle Einblicke in die basalen antiretroviralen Mechanismen ermöglicht. In der folgenden Beschreibung der bedeutendsten antiretroviralen Mechanismen wird besonders auf die anti-HIV-Immunantwort eingegangen, da das Wissen über HIV den Großteil der in anderen Modellsystemen erworbenen Erkenntnisse in sich vereint.

CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind entscheidend für die Kontrolle der Viruslast und die Dauer des symptomfreien Stadiums verantwortlich (Deeks, S. G.; Walker, B. D., 2007; Poropatich, K.; Sullivan, D. J., 2011). Über MHC-Klasse-I-Moleküle bekommen sie aus Degradationsprozessen entstandene, intrazelluläre Polypeptide von allen kernhaltigen Zellen und den Thrombozyten präsentiert. Durch Kreuzpräsentation können zudem auch extrazelluläre Antigene nach der Aufnahme und Prozessierung durch z.B. dendritische Zellen MHC-I-abhängig präsentiert werden (Heath, W. R.; Carbone, F. R., 2001). Auch virale Antigene können so durch den korrespondierenden T-Zell-Rezeptor-Komplex der CD8⁺ CTL erkannt werden. Diese können anschließend die Apoptose infizierter Zelle via Granzym-Sekretion einleiten und antivirale Zytokine wie IFN- γ ausschütten. Eng mit der Funktion der CD8⁺ CTL sind die MHC bzw. HLA-Klasse-I-Allelotypen verbunden. Einige HLA-Varianten sind mit verbesserter Viruskontrolle korreliert, beispielsweise HLA-B5701 bei HIV. Dies wird durch die Induktion einer kreuzreaktiven Immunantwort gegen Gag-Epitope erklärt (Poropatich, K.; Sullivan, D. J., 2011).

CD4⁺ T-Helferzellen (T_h-Zellen) gelten als das Integrationszentrum des Immunsystems. Sie sind maßgeblich für Aktivierungs- und Proliferationssignale für andere Immunzellen verantwortlich. Über MHC-II-Komplexe antigenpräsentierender Zellen bekommen T_h-Zellen Peptide, wie beispielsweise virale Epitope, präsentiert. Daraufhin sezernieren sie bestimmte Zytokine, welche als Signalmoleküle die Funktion anderer Zellen modulieren. Bei der antigenspezifischen T_h-Zell-Antwort wird die T_h1- von der T_h2-Antwort aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinsekretion und Effektorfunktionen unterschieden. Während aktivierte T_h1-Zellen über Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ) eine Stärkung der zellulären Immunität (vor allem der Makrophagen und CTL) bewirken und damit auf intrazelluläre Erreger wie Viren reagieren, stimulieren T_h2-Zellen über B-Lymphozyten die Antikörperantwort und wirken so besonders gegen extrazelluläre Parasiten und Bakterien. Neben diesen beiden T_h-Zellsubpopulationen sind inzwischen einige weitere bekannt, wie beispielsweise T_h17 und regulatorische T-Zellen (T_{reg}) (Murphy, K. P. et al., 2008).

Ohne eine Koaktivierung durch CD4⁺ T_h-Zellen ist die Funktion virusspezifischer CTL geschwächt, so produzieren sie beispielsweise weniger IFN- γ . Dies korreliert mit einer erhöhten Viruslast. Virusspezifische (v.a. Gag-spezifische) CD4⁺-Lymphozyten sind somit für die Aufrechterhaltung einer effektiven CD8⁺ CTL-Antwort essentiell (Altfeld, M.; Rosenberg, E. S., 2000; Deeks, S. G.; Walker, B. D., 2007), sie können darüber hinaus vermutlich auch direkte antivirale Funktionen über IFN- γ und zytolytische Mechanismen wahrnehmen (Norris, P. J. et al., 2001). Auch im *Friend-Virus*-Modell zeigte sich die dreifache Bedeutung von CD4⁺-Lymphozyten: Zum einen sind sie wesentliche Koaktivatoren für CD8⁺ CTL und B-Lymphozyten, zum anderen nehmen CD4⁺ Lymphozyten in der chronischen Infektion auch direkte zytotoxische Funktionen wahr (Hasenkrug, K. J.; Dittmer, U., 2000; Iwashiro, M. et al., 2001). Auch für die Induktion einer virusspezifischen CD8⁺ Gedächtniszell-Antwort scheinen CD4⁺ T_h-Zellen eine kritische Rolle zu spielen (Shedlock, D. J., 2003; Nair, S. R. et al., 2010).

Gleichzeitig stellen CD4⁺ T-Lymphozyten jedoch die Hauptzielzellen von HIV dar (Stevenson, M., 2003). Gerade HIV-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten werden bevorzugt infiziert, der daraus resultierende Verlust der gegen HIV gericht-

teten Immunantwort begünstigt so die Virusreplikation (Douek, D. C. et al., 2002).

Die Rolle regulatorischer T-Lymphozyten in chronischen Infektionen ist noch nicht ausreichend geklärt. Insgesamt scheinen sie einen suppressiven Effekt auf die antivirale T-Zell-Antwort bei HIV zu haben, wirken sich aber gleichzeitig positiv auf die Überaktivierung des Immunsystems aus (Keynan, Y. et al., 2008). Schwierigkeiten bei der Charakterisierung und widersprüchliche Ergebnisse lassen eine abschließende Einschätzung derzeit noch nicht zu (Fazekas St Groth, B. de; Landay, A. L., 2008).

Ein weiterer wichtiger Pfeiler in der Abwehr von HIV ist die Antikörperantwort. Insbesondere neutralisierende Antikörper können Infektion durch Retroviren eindämmen, indem sie dem zellulären Immunsystem die nötige Zeit zur Ausbildung der Effektorzellantwort verschaffen (Hasenkrug, K. J.; Dittmer, U., 2000). Vor allem Antikörper gegen konservierte Domänen, wie die im gp120 lokalisierte CD4-Bindungsstelle bei HIV, können ein breites Spektrum von Virusisolaten neutralisieren, werden jedoch nur von sehr wenigen Virusträgern induziert (Wu, X. et al., 2010). Die Erzeugung einer breiten, kreuzreaktiven neutralisierenden Antikörperantwort ist ein bedeutendes Ziel bei der Entwicklung von HIV-Vakzinen, konnte diese doch in Tierversuchen eine Infektion durch SIV-HIV-Chimäre (SHIV) effektiv verhindern (Montefiori, D. C.; Mascola, J. R., 2009; Ferrantelli, F. et al., 2004). Die Rolle neutralisierender Antikörper bei der Kontrolle einer bereits etablierten Infektion ist dagegen umstritten (Poignard, P. et al., 1999; Deeks, S. G.; Walker, B. D., 2007; Poropatich, K.; Sullivan, D. J., 2011). Neben neutralisierenden Antikörpern könnten auch andere Antikörper-vermittelte Mechanismen, wie die Opsonierung von Viruspartikeln und Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität, an der Elimination von HIV beteiligt sein (Montefiori, D. C. et al., 2007).

Aufseiten der angeborenen Immunabwehr sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen) von besonderer Bedeutung, da sie bereits im frühen Infektionsverlauf infizierte Zellen eliminieren können (Martin, M. P. et al., 2002; Deeks, S. G.; Walker, B. D., 2007). Ihre gesteigerte IFN- γ -Ausschüttung wird heute als ein wichtiger Mechanismus zur Eindämmung der HIV-Infektion angesehen (Poropatich, K.; Sullivan, D. J., 2011). Als weitere Komponente des angebore-

nen Immunsystems bewirken dendritische Zellen eine Ausschüttung von Typ I Interferonen ($\text{INF-}\alpha/\beta$), ihre Bedeutung in der Eindämmung retroviraler Infektion ist jedoch nicht vollends geklärt (Deeks, S. G.; Walker, B. D., 2007; Kane, M. et al., 2011).

Interferone gehören zu den wichtigsten antiviralen Chemokinen. Sie werden in zwei Klassen unterteilt: Typ I Interferone ($\text{INF-}\alpha$ und $\text{INF-}\beta$) werden von verschiedensten Zellen als Antwort auf eine virale Infektion synthetisiert und hemmen die virale Replikation direkt oder über eine Stimulation von Immunzellen. Als einziges Mitglied der Typ II Interferone ist $\text{INF-}\gamma$ ein zentraler Bestandteil der antiviralen Immunantwort. Es kann von nahezu allen antiviral wirksamen Immunzellen – insbesondere von NK-Zellen, CD4^+ und CD8^+ T-Lymphozyten – gebildet werden. Es hat diverse Funktionen: Neben der direkten Stimulation von antiviralen Immunzellen und intrinsischen antiretroviralen Mechanismen fördert es die $\text{T}_\text{H}1$ -Differenzierung und stärkt so die zelluläre Immunantwort. Zusätzlich stimuliert $\text{INF-}\gamma$ die MHC-I- und -II-Expression auf Körperzellen und verbessert deren Antigenprozessierung (Murphy, K. P. et al., 2008).

In den letzten Jahren wurden einige endogene antiretrovirale Mechanismen gegen Retroviren entdeckt. Intrinsische antiretrovirale Moleküle wie APOBEC3G und Trim5 werden von den meisten Körperzellen konstitutiv exprimiert und wirken direkt antiviral (Poropatich, K.; Sullivan, D. J., 2011).

Insgesamt ist festzuhalten, dass keiner der genannten Mechanismen für sich alleine genommen in der Lage zu sein scheint, eine Infektion mit HIV zu kontrollieren oder gar zu verhindern. Erst das Zusammenwirken der zellulären und humoralen Faktoren sowie der adaptiven und angeborenen Immunantwort können den Infektionsverlauf stabilisieren und möglicherweise Neuinfektionen verhindern (Deeks, S. G.; Walker, B. D., 2007).

Im Laufe seiner Evolution hat HIV zudem diverse Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort zu entgehen. So entzieht sich HIV durch Mechanismen wie der starken Glykosylierung von gp120 und seiner abgeschirmten CD4 -Bindungsstelle der Antikörperantwort (Labrijn, A. F. et al., 2003). Desweiteren interagiert das akzessorische Protein Nef mit den MHC-I-Präsentationsmechanismen und verhindert so eine effektive Erkennung durch

CD8⁺ CTL (Wonderlich, E. et al., 2011). HIV scheint zudem über verschiedene inhibierende Moleküle, wie z.B. PD-1, CTLA-4 und TIM-3, an der Erschöpfung der T-Zell-Antwort beteiligt zu sein (Kassu, A. et al., 2010). Der Umstand, dass HIV innerhalb weniger Tage *post infectionem* eine latente Infektion ohne Expression von virusspezifischen Antigenen etabliert, erschwert die Viruselimination und führt zur Ausbildung langfristiger viraler Reservoirs in Gedächtniszellen und Makrophagen (Stevenson, M., 2003; Margolis, D. M., 2010). Die exzessive Virusproduktion (bis 10¹⁰ Viruspartikel pro Tag) geht durch die hohe Mutationsfrequenz mit einer großen Anzahl an *Escape*-Mutanten einher und erschwert den dauerhaften Erfolg von Impfstoffen und antiretroviralen Therapeutika (Simon, V. et al., 2006; Deeks, S. G.; Walker, B. D., 2007).

1.2 Tiermodelle retroviraler Infektionen

Die Erforschung einer effektiven HIV-Vakzine erfordert ein adäquates Tiermodell. Es lassen sich jedoch neben dem Menschen nur Schimpansen reproduzierbar mit HIV-1 infizieren, ein Fortschreiten zu AIDS wurde jedoch auch bei diesen nur in Einzelfällen berichtet und es gibt einige Unterschiede in der Immunantwort gegen HIV (Rutjens, E. et al., 2003). Derzeit gilt das SIV-Modell in nicht-humanen Primaten als dasjenige Tiermodell, welches das Potenzial neuer Vakzinierungsstrategien am besten einzuschätzen erlaubt, da es sowohl auf molekularer Ebene als auch hinsichtlich der Pathogenese HIV besonders ähnlich ist. Auch SIV-HIV-Chimären (SHIV; nutzt gleiche Korezeptoren wie HIV) fanden breite Verwendung in der HIV-Forschung, werden jedoch zunehmend hinsichtlich ihrer Aussagekraft hinterfragt (Feinberg, M. B.; Moore, J. P., 2002; Watkins, D. I. et al., 2008). Nicht-humane Primaten-Modelle werden jedoch durch zahlreiche Faktoren limitiert: Die Anzahl erhältlicher Versuchstiere ist aufgrund ethischer und finanzieller Bedenken begrenzt, gleichzeitig weisen sie eine hohe genetische Heterogenität auf. Zudem unterscheidet sich der SIV-Infektionsverlauf hinsichtlich einiger Aspekte von HIV (Giri, M. et al., 2004; Pandrea, I. V. et al., 2007).

Mausmodelle zeichnen sich durch ein ausgereiftes System immunologischer Manipulationsmöglichkeiten aus, wie etwa der Verfügbarkeit rekombinanter und transgener Stämme, somatischer Depletions- und Stimulationsmechanismen und einer Vielzahl molekularer Marker zur Charakterisierung der Immun-

antwort. Das murine *Friend Virus* ähnelt HIV in der Kinetik der Immunantwort und der Zielzellen, der Etablierung persistierender Infektionen sowie der Infektionsmodi (über freies Virus und Zell-Zell-Transmission) (Hasenkrug, K. J. et al., 1999; Hasenkrug, K. J.; Dittmer, U., 2000). Es hat in der Vergangenheit maßgeblich zum Verständnis retroviraler Infektionen beigetragen (Hasenkrug, K. J. et al., 1998a; Dittmer, U.; Hasenkrug, K. J., 2001). Andererseits sind durch die Unterschiede zu humanpathogenen Retroviren viele Aussagen bezüglich deren spezifischer Pathologie nur sehr eingeschränkt möglich (Hasenkrug, K. J.; Dittmer, U., 2000).

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Entwicklung humanisierter Mäuse gemacht. Die Transplantation menschlicher Immunzellen in Mäuse mit verschiedenen Immundefektsyndromen ermöglicht eine HIV-Infektion, deren Immunkinetik und Infektionsrouten denen von HIV im Menschen ähneln (van Duyne, R. et al., 2009; Berges, B. K.; Rowan, M. R., 2011; Lavender, K. J. et al., 2013). Allerdings ist die Herstellung humanisierter Mäuse technisch aufwändig und es bestehen weiterhin vielfältige Limitierungen bei deren Nutzung (Akkina, R., 2013). Dennoch stellen humanisierte Mäuse vielversprechende Modelle für die Vakzinentwicklung dar.

1.3 Antiretrovirale Vakzinierungsstrategien

Impfungen gehören zu den effektivsten und effizientesten Maßnahmen in der Medizin und haben zur globalen und regionalen Ausrottung bedeutender Krankheitserreger geführt. Das ultimative Ziel der HIV-Vakzinierungsstrategien ist es daher, einen effektiv schützenden, sicher anzuwendenden und kosteneffizient produzierbaren Impfstoff zu entwickeln, der breiten Teilen der Erdbevölkerung einen präventiven Schutz vor einer HIV-Infektion bietet. Ein idealer Impfstoff müsste eine breite Immunantwort sowohl neutralisierender Antikörper als auch kreuzreaktiver T-Zellen gegen ein weites Spektrum heterologer HIV-Isotypen hervorrufen (P. Sanou, M., 2012). Bisher ist jedoch gerade die CTL-Antwort tendenziell zu stark auf spezifische Epitope fokussiert (Poropatich, K.; Sullivan, D. J., 2011). Ein weiterer Ansatz ist über therapeutische Vakzinierung eine Immunmodulation zu bewirken und so das Fortschreiten einer stattgehabten Infektion zu AIDS zu verhindern. Dies erfordert vor allem eine starke zelluläre Immunität. Diese beiden Ziele mussten jedoch in

der Vergangenheit aufgrund diverser Rückschläge relativiert werden. Zurzeit ist daher der Fokus zunehmend auf die Erforschung einer die Viruslast reduzierenden Vakzine gerichtet, welche die Virustransmission verringert und den Krankheitsprozess verlangsamt, was einen signifikanten Effekt auf die HIV-Pandemie hätte (International AIDS Vaccine Initiative, 2008).

Die größten Herausforderungen für die Vakzinentwicklung sind das kurze Zeitfenster vor der Etablierung einer lebenslangen Infektion, die Hypervariabilität des Virusgenoms, der Mangel an messbaren Korrelaten für einen effektiven Schutz (Kim, J. H. et al., 2010) sowie der Mangel an adäquaten Tiermodellen. Doch einige vielversprechende Tatsachen geben Anlass zur Hoffnung: Nicht-humane Primaten konnten effektiv vor SIV und SHIV geschützt werden; das Auftreten von Elite-Controllern und nachweislich HIV-exponierten, nicht-infizierten Personen lässt auf einen zumindest partiell-effektiven Schutz schließen (International AIDS Vaccine Initiative, 2008); in den letzten Jahren wurden mehr als ein Dutzend breit-neutralisierende Antikörper identifiziert (Kwong, P. D. et al., 2011) und es ließ sich zum ersten Mal ein geringer protektiver Effekt eines Impfstoffes in einer Studie am Menschen nachweisen (Rerks-Ngarm, S. et al., 2009).

Es wurden bereits diverse Vakzinierungsstrategien für retrovirale Infektionen entwickelt. Zu den wichtigsten zählen:

- Peptid- oder Protein-Subunitvakzine und inaktivierte Viren: enthalten immunogene (hauptsächlich Env-kodierte) retrovirale Proteinbestandteile und können über den MHC-Klasse-II-Präsentationsweg starke Antikörperantworten induzieren, haben jedoch nur geringen Einfluss auf die Ausbildung einer zellulären Immunität (Letvin, N. L., 2002).
- DNA-Vakzine und Gentransfer: Einbringen von DNA-Fragmenten über Plasmide oder virale Vektoren mit konsekutiver Genexpression, Präsentation degradierter Proteine sowohl über MHC-I- als auch -II-Komplexe und damit Induktion von zellulären und humoralen Immunantworten, im Menschen jedoch vergleichsweise gering ausgeprägt (Kutzler, M. A.; Weiner, D. B., 2008). Alternativ MHC-unabhängige Produktion von Antikörpern oder anderer antiretroviral wirksamer Moleküle per Gentransfer (Johnson, P. R. et al., 2009).

- Rekombinante virale Vektoren: Derivate von Pocken- und Adenoviren, allem voran Modifiziertes Vakziniavirus Ankara und Adenovirus Typ 5. Effektive Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten möglich, Mechanismus ähnlich wie bei DNA-Vakzinen (Girard, M. P. et al., 2006).
- Lebend-attenuierte Viren: Virulenzminderung meist durch Deletionen bei erhaltener Replikationskompetenz. Beste protektive Wirkung durch Induktion aller wesentlichen Komponenten der Immunabwehr (Koff, W. C. et al., 2006; Dittmer, U. et al., 1998). Gefahr von Rückmutationen oder Rekombinationen mit endogenen Retroviren, insertionelle Mutationsinduktion und Virulenz beim Einsatz in Immunkompromittierten (Whitney, J. B.; Ruprecht, R. M., 2004).
- *Virus-like Particles*: Nach Transduktion durch z.B. Expressionsvektoren spontanes Zusammenlagern zu Pseudo-Virionen. Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten möglich (Girard, M. P. et al., 2006).

Replizierende virale Vektoren scheinen insgesamt das größte Potenzial zu bieten, vermutlich aufgrund einer beständigen Replikation und Expression viraler Immunogene (International AIDS Vaccine Initiative, 2008).

Im murinen FV-Modell wurden bislang unter anderem Peptid-Subunit-Vakzine (Hunsmann, G. et al., 1981), DNA-Impfstoffe sowie attenuierte und rekombinante virale Impfvektoren (Earl, P. L. et al., 1986; Hasenkrug, K. J. et al., 1998b; Dittmer, U.; Hasenkrug, K. J., 2001; Bayer, W. et al., 2008) mit einigem Erfolg getestet, doch ein vollständiger Schutz hochsuszeptibler Mäuse gegen die FV-induzierte Krankheit konnte nur durch lebend-attenuiertes F-MuLV erreicht werden (Dittmer, U. et al., 1999a, Dittmer, U. et al., 1998). Es zeigte sich in diesem Setting zudem, dass alle drei wesentlichen Lymphozytenfraktionen (B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten) für einen effektiven Schutz essentiell sind (Hasenkrug, K. J. et al., 1999).

Zur Immunisierung gegen FV eingesetzte adenovirale Vektoren waren in der Lage, durch eine kombinierte Expression und direkte Präsentation von FV-Proteinen starke Antworten von CD4⁺ T-Zellen und neutralisierenden Antikörpern zu induzieren (Bayer, W. et al., 2010) und so die Viruslast effektiv zu reduzieren. Bislang konnte jedoch keine sichere Vakzine eine sterile Immunität hervorrufen, also eine Infektion vollständig zu beseitigen, was vermutlich

durch die unzureichende Induktion einer robusten CD8⁺ CTL-Antwort bedingt ist. In akut FV-infizierten Mäusen sind jedoch bis zu 10 % aller CD8⁺ T-Zellen spezifisch für ein immundominantes CD8⁺-CTL-Epitop in der sogenannten *Leader Region* des Gag-Polypoteins (Zelinsky, G. et al., 2006). Dies könnte einen Ansatzpunkt für die Entwicklung einer verbesserten CD8⁺ CTL-induzierenden Vakzine darstellen.

Von den bisher in nicht-humanen Primaten getesteten antiretroviralen Vakzinierungsstrategien zeigte ebenfalls lebend-attenuiertes SIV die mit Abstand beste protektive Wirkung (Koff, W. C. et al., 2006). Im Menschen wurden bislang erst wenige Effektivitätsstudien durchgeführt. Die sogenannte STEP-Studie, welche auf einer ausschließlichen Induktion einer zellulären Immunität durch eine replikationsinkompetente Ad5 Gag/Pol/Nef-Vakzine basierte, wurde 2007 vorzeitig beendet, nachdem sich kein Schutz, für bestimmte Subpopulationen dagegen ein erhöhtes Risiko für eine HIV-Infektion herauskristallisierte (Buchbinder, S. P. et al., 2008). Eine weitere groß angelegte Studie (RV144) untersuchte die Effektivität einer heterologen Prime-Boost-Impfung mit einem rekombinanten Kanarienvockenvektor (Env und Gag/Pro) und einem gp120-Subunit-Impfstoff (Env). In dieser auch als *Thai Trial* bekannt gewordenen Untersuchung zeigte sich zum ersten Mal ein leicht schützender Effekt, die Viruslast nach erfolgter Infektion wurde jedoch nicht gesenkt (Rerks-Ngarm, S. et al., 2009). Im April 2013 musste eine multizentrische Vakzinierungsstudie (HVTN 505) mit einem Prime-Boost-Konzept mittels DNA-Plasmid (Gag/Pol/Env/Nef) und Ad5-Vektor (Gag/Pol/Env) mit Sequenzen multipler HIV-Stämme in der Phase IIb eingestellt werden, da der Impfstoff weder die Infektionsraten, noch die Viruslast wirksam reduzieren konnte (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2013).

Trotz bescheidener Erfolge sind also weitere Anstrengungen zur Verbesserung der Vakzinierungsstrategien nötig, um die Restriktionen der bisherigen Ansätze zu überwinden.

1.4 Verbesserung des Immunsierungserfolgs

Der Erfolg einer Impfung ist maßgeblich von der Immunogenität der eingebrachten Vakzine abhängig. Verschiedene Ansätze zu deren Verbesserung wurden in der Vergangenheit verfolgt:

Eine Methode ist die Koadministration bzw. -expression von Zytokinen. Dabei handelt es sich um Signalmoleküle, welche diverse Zellfunktionen modulieren und wichtige Aufgaben in der Immunhomöostase erfüllen. Proinflammatorische T_H1 -Zytokine wie IFN- γ und IL-2 bewirken eine Stärkung der zellulären Immunität, während T_H2 -Zytokine (u.a. IL-4, IL-10, IL-13) die Antikörperantwort verbessern (Murphy, K. P. et al., 2008; O'Garra, A., 1998). Für die Zytokine beider Klassen ist eine reziproke Hemmung beschrieben.

Weiterhin konnte über die Koadministration kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 (Maue, A. C. et al., 2004), oder die selektive Inhibition negativer Regulatoren wie CTLA-4 (Lu, M. et al., 2005) und PD-1 (Ha, S.-J. et al., 2008) eine Verbesserung von Immunisierungsergebnissen in Vakzinierungen mit DNA und Vakzinia-Virus erzielt werden.

Epitope Enhancement bezeichnet die Modifizierung von Epitopsequenzen mit dem Ziel, deren Affinität zu MHC-Molekülen oder die des resultierenden MHC-Peptid Komplexes zum korrespondierenden T-Zell-Rezeptor zu erhöhen. In einem weiteren Ansatz wird versucht, über Sequenzalterationen eines zuvor eher spezifischen Epitops die Induktion kreuzreaktiver T-Zellen zu erreichen (Berzofsky, J. A. et al., 2001). Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch die Effizienz der Antigenprozessierung. Diese ist unter anderem von den Epitop-flankierenden Sequenzen abhängig (Pamer, E.; Cresswell, P., 1998). Durch entsprechende Modifikationen konnte eine Steigerung der Immunogenität einer DNA-Vakzine verwirklicht werden (Livingston, B. D. et al., 2001).

1.5 Adenovirale Vektoren

Adenovirale Vektoren werden aufgrund ihrer Eigenschaften vielfältig genutzt, u.a. für Vakzinierungen, Gensupplementierung, Krebstherapie und Onkolyse. Humane Adenoviren sind in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Zelltypen sowohl sich teilender als auch postmitotischer Zellen zu infizieren. Durch die

Entfernung regulatorischer Gene (besonders der E1-Gene) lassen sich replikationsdefekte Vektoren erzeugen, zudem wird deren Transgenkapazität durch zusätzliche Deletionen weiter gesteigert (auf bis zu 28 kb). Dies ermöglicht eine effiziente Produktion viraler Vektoren bei gleichzeitig hoher Transduktionseffektivität (Wilson, J. M., 1996). Die Deletion der E3-Gene, welche eine Immunevasion bei nativen Adenoviren bewirkt, führte zu einer gesteigerten Immunogenität der Impfvektoren. Dies ist bei Vakzinierungen – im Gegensatz zu Genersatztherapien – erwünscht, da man sich davon einen adjuvanten Effekt für die Transgenimmunogenität verspricht, insbesondere konnte eine verstärkte CD8⁺ CTL-Antwort gezeigt werden (Xiang, Z. Q. et al., 1996; Kay, M. A. et al., 2001).

Das humane Adenovirus Typ 5 (Ad5) gehört zu den am besten untersuchten Adenoviren und wird häufig als Vektor für Vakzinierungs- und Gentransferexperimente genutzt. Ein Nachteil bei der Nutzung als Impfstoff ist jedoch die teils hohe Seroprävalenz gegen Ad5 in der Bevölkerung, welche zu einer vorzeitigen Inaktivierung der Vektoren führt. Eine präexistente Immunität kann jedoch durch Verwendung anderer Adenovirus-Typen bzw. Chimären oder eines heterologen Impfschemas verringert werden (Lemckert, A. A. C. et al., 2005).

Adenovirale Vektoren wurden erfolgreich für antiretrovirale Vakzinierungen in Mäusen (Bayer, W. et al., 2008) sowie nicht-humanen Primaten (Shiver, J. W.; Emini, E. A., 2004) evaluiert und sind Bestandteil verschiedener HIV-Immunisierungsstudien im Menschen (International AIDS Vaccine Initiative, 2008).

1.6 Das Friend Virus

Viele Erkenntnisse zur Biologie von Retroviren und der antiretroviralen Immunität entstammen den Murinen Leukämieviren (MuLV). Anders als HIV verfügt das nach seiner Erstbeschreiberin Charlotte Friend benannte Friend Leukämie Virus (FV) der Mäuse als Gammaretrovirus nur über ein einfaches Genom ohne Sequenzen für die Expression regulatorischer und akzessorischer Proteine. Bei vielen Mausstämmen führt eine Infektion mit FV zu einer malignen Erythroleukämie mit konsekutiver Splenomegalie und Anämie (Friend, C.,

1957), und das – anders als bei den meisten einfachen Retroviren – auch bei adulten Tieren (Hasenkrug, K. J.; Chesebro, B., 1997). Davon abgesehen ähnelt der Aufbau und Replikationszyklus dem von HIV. Das Env-kodierte Oberflächenmolekül gp70 ist für die Rezeptorbindung an Zielzellen und die Antikörperantwort relevant (Hunter, E.; Swanstrom, R., 1990). Diese Zielzellen sind bei der Maus vor allem erythropoietische Vorläuferzellen, daneben auch Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (Mitchell, T., 1993), wobei ruhende B-Lymphozyten in der persistierenden Infektion als Virusreservoir eine besondere Stellung einnehmen (Hasenkrug, K. J. et al., 1998a; Dittmer, U.; Hasenkrug, K. J., 2001).

Das FV ist ein Komplex aus dem apathogenen, replikationskompetenten Helfervirus F-MuLV und dem pathogenen *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV), das sich aufgrund mehrerer genomischer Deletionen ohne F-MuLV nicht replizieren kann (Clark, S. P.; Mak, T. W., 1983). Pathogenetisch bedeutsam ist das veränderte Glykoprotein gp55, das den murinen Erythropoietin-Rezeptor konstitutiv aktiviert und so eine polyklonale Expansion erythroider Zellen hervorruft (Li, J.-P. et al., 1990; Hoatlin, M. E. et al., 1990). Aus der zusätzlichen Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen im Rahmen der Formation des Provirus resultiert letztlich die Erythroleukämie und Splenomegalie, welche innerhalb weniger Wochen zum Tod adulter Tiere führen kann (Kabat, D., 1989). Nicht alle Mausstämme sterben jedoch an einer FV-Infektion, verschiedene Faktoren entscheiden über deren Suszeptibilität. Immunologische Eigenschaften sind:

- MHC-Gene: Der *H-2D*-Genlokus kodiert für MHC-Klasse I-Moleküle, welche wichtige FV-Peptide präsentieren und hat so einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die CD8⁺ als auch auf die CD4⁺ T-Zell-Antwort. Die MHC II-Gene *H-2A* und *H-2E* sind ebenfalls für CD4⁺ T-Zell-Antwort bedeutsam (Hasenkrug, K. J.; Chesebro, B., 1997).
- Das *Rfv-3*-Gen, welches für die Bildung neutralisierender Antikörper entscheidend ist (Miyazawa, M. et al., 2008).

Zusätzlich sind noch mehrere nicht-immunologische Mechanismen an der Resistenzbildung gegen FV beteiligt:

- *Fv1* interferiert mit dem Prointegrationskomplex und unterbindet so die FV-Replikation (Miyazawa, M. et al., 2008).
- *Fv2* kodiert eine trunkierte Form der zellulären Kinase Stk, welche die Signaltransduktion am Erythropoietinrezeptor vermittelt. Ohne diese defekte Kinase kommt bei intakter T-Zell-Antwort keine Überaktivierung des Rezeptors zustande (*Fv2^{r/r}*) (Nishigaki, K. et al., 2001; Miyazawa, M. et al., 2008).

Darüber hinaus existieren weitere immunologische und nicht-immunologische Mechanismen der Resistenzbildung.

Zwei typische Mausstämmen verdeutlichen diese Suszeptibilitätstypen: BALB/c-Mäuse (*H2^{d/d}*, *Fv2^{s/s}*, *Rfv3^{s/s}*) sind höchstsuszeptibel für eine FV-Infektion und weisen eine stark ausgeprägte Pathologie auf, während Mäuse des C57BL/6 (*H2^{b/b}* *Fv2^{r/r}* *Rfv3^{r/r}*)-Stammes weder Leukämie noch Splenomegalie entwickeln. CB6F1 (*H2^{b/d}* *Fv2^{r/s}* *Rfv3^{r/s}*)-Hybridmäuse sind eine Kreuzung der zuvor genannten Stämme und sind hoch suszeptibel für die FV-induzierte Erkrankung.

Tabelle 1: Genotyp und Suszeptibilität

Suszeptibilität	hoch	mittel	gering
H-2D-Haplotyp	d/d	b/d	b/b
Rfv-3	s/s	s/r	r/r
Fv2	s/s	s/r	r/r

Alle drei wesentlichen Komponenten der antiretroviralen Immunantwort scheinen bei der Prävention und Erholung von der FV-induzierten Krankheit eine Rolle zu spielen (Hasenkrug, K. J.; Dittmer, U., 2000; Dittmer, U. et al., 1999b): In der akuten Infektion sind eine starke CD8⁺ CTL-Antwort (Zelinskyy, G. et al., 2004) und kostimulierende CD4⁺-Lymphozyten zu deren Aufrechterhaltung (Nair, S. R. et al., 2010) sowie neutralisierende Antikörper essentiell für die Eindämmung der Virusausbreitung (Hasenkrug, K. J.; Chesebro, B., 1997). An eine überlebte akute FV-Infektion schließt sich die chronisch-persistierende Phase an, in der die Immunantwort der CD4⁺ T-Zellen über die Viruskontrolle entscheidet (Hasenkrug, K. J. et al., 1998a; Miyazawa, M. et al., 2008), wobei FV-spezifische CD4⁺ Lymphozyten auch direkte antivirale Funkti-

onen erfüllen können, wie etwa eine Sekretion von IFN- γ und Fas/FasL-Interaktionen (Iwashiro, M. et al., 2001; Zelinskyy, G. et al., 2004). Im Infektionsverlauf sind auch regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) von Bedeutung. Sie schränken die Funktionalität, insbesondere die IFN- γ -Produktion, von CD4⁺ und CD8⁺ Effektorzellen sowohl in der späten Akutphase als auch in der chronischen Phase der Infektion ein und tragen so zur Etablierung einer Persistenz von FV bei (Dittmer, U. et al., 2004; Nair, S. R. et al., 2010).

Das FV-Modell gehört derzeit zu den ausgereiftesten und am besten untersuchten Modellen retroviraler Infektionen und liefert wertvolle Einblicke in deren zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen. Darüber hinaus kann der Erkenntnisgewinn aus Vakzinierungen zu generellen Verbesserungen von antiretroviralen Impfstrategien genutzt werden, wie etwa zur Optimierung der Immunogenität eingebrachter Vektoren.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation von Strategien zur Verbesserung der Immunantwort zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺ CTL) im murinen *Friend-Virus*-Modell, um auf diesem Wege den Impferfolg gegen das Retrovirus zu verbessern. Die gewonnen Erkenntnisse könnten der Entwicklung von Vakzinen gegen humane retrovirale Infektionserreger – wie z.B. HIV – dienen. In vorangegangenen Projekten konnte gezeigt werden, dass sich rekombinante adenovirale Vektoren, die Env- und Gag-Sequenzen des FV kodieren, für die Impfung susceptibler Mäuse eignen und deren Viruslast nach einer Infektion mit FV signifikant reduzieren. Dieser Effekt konnte vor allem auf eine verbesserte Induktion neutralisierender Antikörper und spezifischer CD4⁺ T-Zellen zurückgeführt werden (Bayer, W. et al., 2010). Mit den bislang verwendeten Impfvektoren konnte allerdings noch keine sterile Immunität erreicht werden, was vermutlich durch die fehlende Induktion einer robusten CD8⁺ CTL-Antwort bedingt ist. Mit der Herstellung rekombinanter Impfvektoren, welche das ausstehende dritte FV-Gen *PoI* oder eine modifizierte Gag-Sequenz als Transgen enthielten, sollte eine Stärkung der CD8⁺ CTL-Antwort und des Impferfolgs erreicht werden. Darüber hinaus wurde durch die Koadministration Zytokin-kodierender Vektoren eine weitere Verbesserung der CD8⁺ CTL-Antwort angestrebt.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Air Clean 600 PCR Workstation	STARLAB (Ahrensburg)
AutoMACS Pro	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CO ₂ -Brutschrank Heraeus B6/ MaxQ 6000	Thermo Scientific (Dreieich)
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson (Heidelberg)
Elektrophoresesystem	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Elektroporator Gene Pulser Xcell	BioRad (München)
Geldokumentationskammer	Syngene (Darmstadt)
Lichtmikroskop	Hund (Wetzlar)
pH-Meter	Schott Instruments (Mainz)
Photometer BioPhotometer plus	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	STARLAB (Ahrensburg) / Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe Multipipette plus	Eppendorf (Hamburg)
Präzisionswaage 440-47N	Kern & Sohn (Balingen)
Thermocycler	
C1000 Thermal Cycler	BioRad (München)
Step One	Applied Biosystems (Darmstadt)
Thermomixer HLC MHR 11	DITABIS (Pforzheim)
Tiefkühlschrank MDF-U5386S	SANYO (Wiesloch)
Vortex Genius 3	IKA (Staufen)
Wasserbad ED-5M	JULABO (Seelbach)
Werkbänke	
KOJAIR	KOJAIR (Meckenheim)
Herasafe	Heraeus (München)
Western-Blot-Geräte	BioRad (München)
Zellzähler Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience (Lawrence, USA)
Zentrifugen	
4-16K	Sigma (Osterode am Harz)
5430R/5424	Eppendorf (Hamburg)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material

96-, 24-, 6-Loch-Platte
 Einmalspritzen steril
 FACS-Röhrchen
 Falcon cell strainer
 MicroAmp Fast Optical 48-Well
 Reaction Plate & Adhesive Film
 Pipettenspitzen
 Pipettenspitzen steril
 PP-Schraubenverschluss Röhrchen
 steril
 Reaktionsgefäße
 Sterilfilter
 Western-Blot-Film
 Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm²)
 Zellkulturflaschen (300 cm²)

Hersteller

Greiner Bio One (Frickenhausen)
 Becton Dickinson (Heidelberg)
 Becton Dickinson (Heidelberg)
 Becton Dickinson (Heidelberg)
 Applied Biosystems (Darmstadt)

 Eppendorf (Hamburg)
 STARLAB (Ahrensburg)
 Greiner Bio One (Frickenhausen)

 Eppendorf (Hamburg)
 TPP (Trasadingen, CH)
 Kodak (Stuttgart)
 Greiner Bio One (Frickenhausen)
 TPP (Trasadingen, CH)

2.3 Chemikalien

Chemikalie

Acrylamid
 AEC (3-Amino-9-ethyl-carbazol)
 Agarose
 Ammoniumpersulfat
 Ampicillin
 Anamycinsulfat
 Aqua bidest
 Bovines Serum-Albumin
 Dimethylformamid (DMFA)
 Dimethylsulfoxid
 dNTP-Mix
 Ethanol
 Ethidiumbromid 1 %
 Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)

Hersteller

AppliChem (Darmstadt)
 Sigma (München)
 Biozym (Hessisch Oldendorf)
 AppliChem (Darmstadt)
 AppliChem (Darmstadt)
 Roth (Karlsruhe)
 Braun (Melsungen)
 PAA (Cölbe)
 Merck (Darmstadt)
 AppliChem (Darmstadt)
 Fermentas (St. Leon-Rot)
 Sigma (München)
 AppliChem (Darmstadt)
 AppliChem (Darmstadt)

FACS-Flow/Rinse/Clean	Becton Dickinson (Heidelberg)
Fetales Kälberserum	Biochrom KG (Berlin)
Formaldehyd	AppliChem (Darmstadt)
Glukose	AppliChem (Darmstadt)
Glycerol	AppliChem (Darmstadt)
Glycin	AppliChem (Darmstadt)
Heparin	AppliChem (Darmstadt)
Hepes	PAA (Cölbe)
HRP-Substrat (Luminol)	AppliChem (Darmstadt)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden)
Isopropanol	VWR (Darmstadt)
L-Glutamin	AppliChem (Darmstadt)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	J.T. Baker (Deventer, NL)
Methanol	J.T. Baker (Deventer, NL)
Natriumacetat	J.T. Baker (Deventer, NL)
Natriumazid	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid	J.T. Baker (Deventer, NL)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Pyronin Y	AppliChem (Darmstadt)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	GE Healthcare (München)
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-HCl	Roth (Karlsruhe)
Tris-Acetat-EDTA	AppliChem (Darmstadt)
TRIzol	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA	PAA (Cölbe)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	AppliChem (Darmstadt)

2.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Phusion Hot Start DNA-Polymerase	Finnzymes (Vantaa, FI)

Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
T4 DNA-Ligase	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
Taq-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.5 Reagenzsysteme

System	Hersteller
Adenopack 20/100	Vivascience Sartorius (Göttingen)
Cytofix/Cytoperm Intracellular staining kit	Becton Dickinson (Heidelberg)
Jetsorb Gel Extraction	Genomed (Löhne)
NucleoSpin Extract/Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)
TA-Cloning-Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

2.6 Puffer und Lösungen

System	Zusammensetzung
10x Trypsin/EDTA	0,5 % (w/v) Trypsin in 10x PBS 0,1 % (w/v) EDTA in 10x PBS
1x Laufpuffer	0,25 M Tris-Base 1,9 M Glycin
1x Laufpuffer	10 % (v/v) 10x Laufpuffer 0,1 % (w/v) SDS
AEC-Gebrauchslösung	5 % AEC-Stammlösung in 0,05 M Natriumacetat
AEC-Stammlösung	4 mg/ml in Dimethylformamid
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin
Blockpuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-T
Boehringer Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 40 mM NaF 5 mM EDTA

	5 mM EGTA
	1 % (v/v) Nonidet P40
	0,1 % (w/v) Natriumdesoxycholat
	0,1 % SDS
DNA-Ladepuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	30 % (w/v) Glycerol
Ethidiumbromid-Stammlösung	1 % (w/v) Ethidiumbromid
FACS-Puffer	0,1 % BSA in PBS
	0,02 % Natriumazid in PBS
HBS (2x)	1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat
	50 mM Hepes, pH 7,05
	10 mM Kalziumchlorid
	280 mM Natriumchlorid
	500 ml H ₂ O _{dest} , pH 7,05
Kanamycin-Stammlösung	50 mg/ml Kanamycin
OD-Lyse-Puffer	0,1 % (w/v) SDS
	1 mM EDTA
	10 mM Tris-HCL
PBBS	0,1 % (w/v) Glukose in PBS
PBS-T	0,1 % (v/v) Tween 20
SDS-PAGE-Puffer (Lämmli)	150 mM TrisHCl
	30 % (v/v) Glycerol
	1,2 % (w/v) SDS
	0,0018 % (w/v) Bromphenolblau
	15 % (v/v) β-Mercaptoethanol
TAE (Tris-Azetat-EDTA)	40 mM Tris
	5 mM NaOAc
	1 mM EDTA
Transferpuffer	8 % (v/v) 10x Laufpuffer
	20 % (v/v) Methanol

2.7 Medien

Alle Nährmedien für Bakterienkulturen wurden nach dem Ansetzen autoklaviert. Die entsprechenden Platten wurden durch Zusatz von 2 % (w/v) Agar zum Medium hergestellt.

Medien für eukaryotische Kulturen

Medium	Hersteller
AIM-V	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
+ 10 % FCS	
+ 1 % Penicillin/Streptomycin	
R10	
RPMI1640	
+ 10 % FCS	
+ 1 % Penicillin/Streptomycin	
+ 0,1 % β -Mercaptoethanol	
+ 10 mM Hepes	
+ 2 mM L-Glutamin	
RPMI	PAA (Cölbe)
RPMI1640	
+ 10 % FCS	
+ 1 % Penicillin/Streptomycin	

Medien für Bakterienkulturen

Medium	Zusammensetzung
LB	1 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) Bacto-Peptone 0,5 % (w/v) NaCl
SOC	2 % (w/v) Bacto-Peptone 1 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,1 % (w/v) NaCl 20 mM Glucose

2.8 Plasmide

Name	Beschreibung
pAdEasy-1	Rekombinationsplasmid, welches das Genom des Adenovirus Typ 5 mit Deletionen der E1- und E3-Region enthält und durch homologe Rekombination mit pShuttle die Erzeugung rekombinanter Adenoviren ermöglicht (He, T. C. et al., 1998).
pBR322-FB29	Klonierungsvektor, der die komplette Sequenz des F-MuLV-Stamms FB29 enthält.
pGEM	TA-Klonierungsvektor, zur direkten Klonierung von PCR-Produkten mit Adenosin-Überhängen (Promega, Mannheim).
pmaxGFP	Kontrollvektor, welcher das grün fluoreszierende Protein exprimiert (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf).
pShuttle-CMV	Klonierungsvektor für die Herstellung rekombinanter Adenoviren mit Hilfe des AdEasy™-Systems. Erlaubt die Klonierung eines Transgens unter CMV-Promotor-Kontrolle (He, T. C. et al., 1998).
pVaxmDecOvaOLLAS	Kontrollvektor, welcher die OLLAS-Sequenz exprimiert (von Prof. Matthias Tenbusch zu Verfügung gestellt).

2.9 Oligonukleotide

Oligonukleotid-Primer wurden bei biomers (Ulm) bezogen.

Name	Sequenz
FV antisense	5'- AGT GCC TGG TAA GCT CCC TGT - 3'
FV sense	5'- AAG TCT CCC CCC GCC TCT A -3'
FV Sonde	6-Fam-ACT CCC ACA TTG ATT TCC CCG TCC-Tamra
Pol1HindIIIasPstI	5'- GAT CCT GCA GTC GAT AAG CTT CTA CCC ATC -3'
Pol2HindIIIIsense	5'-AAA GCT TTC CCA ACC AAG AA -3'
PolPstI	5'- CTG CAG GGA GGT CCC GCG GGT CAA TCT T -3'
PolSalI	5'- GTC GAC ATG ACC TTA GAC GAT CAG GGA GGT CAG G -3'

2.10 Standards

Name	Hersteller
100bp-DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
1kb-Plus-DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
Prestained Precision Protein- Standard	BioRad (München)

2.11 Peptide

Name	Beschreibung
AbuAbuLAbuLTVFL	F-MuLV spezifisches CD8 ⁺ CTL-Epitop aus der Leader-Region des Gag- Proteins. Die in der Originalsequenz vorhandenen Cysteinreste wurden durch α -Aminobuttersäure ersetzt (PANATecs, Tübingen).

2.12 Antikörper und Tetramere

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Antikörper von Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen.

Antikörper Virämie und IC-Assay

AK720 (Maus- α -F-MuLV env)

Kaninchen- α -Maus Ig-HRP

Western-Blot-Antikörper

Erstantikörper

Zweitantikörper

Ziege- α -Maus Ig-RPE

Beschreibung

Zellkulturüberstand der Hybridoma-Zelllinie H720 (AG Dittmer, Essen)
Dako (Hamburg)

Beschreibung

monoklonaler Ratte- α -OLLAS-Antikörper (Prof. Matthias Tenbusch)
monoklonaler Kaninchen- α -Ratte-HRP Antikörper (Dako, Hamburg)
Dako (Hamburg)

Fluoreszenzmarkierte Antikörper

CD107a-FITC/APC; monoklonaler Ratte- α -Maus Antikörper

CD43-FITC/PE; monoklonaler Ratte- α -Maus Antikörper

CD4-AF700; monoklonaler Ratte- α -Maus Antikörper

CD62L-PeCy7; monoklonaler Ratte- α -Maus Antikörper

CD8a-eF450/FITC/PE; monoklonaler Ratte- α -Maus Antikörper

GzmB-APC; monoklonaler Ratte- α -Human Antikörper

IFN- γ -FITC/APC; monoklonaler Ratte- α -Maus Antikörper

IL-2-PE; monoklonaler Ratte- α -Maus Antikörper

TNF- α -PeCy7; monoklonaler Ratte- α -Maus Antikörper

Klon

1D4B

1B11

RM4-5

MEL-14

53-6.7

GB12

XMG1.2

JES6-5H4

MP6-XT22

Tetramere

Phycoerythrin (PE)-MHC-I-
AbuAbuLAbuLTVFL-Tetramer

Beschreibung

Von K. Schepers und T. N. M. Schuhmacher zur Verfügung gestellt.

2.13 Bakterien und Zelllinien**Bakterienstamm**

Escherichia coli BJ5813

Escherichia coli DH10B

Escherichia coli DH5 α

Beschreibung

endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str^R) (Invitrogen, Karlsruhe)

F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)
 ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 *recA1*
endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 *galU*
galK λ -rpsL *nupG* (Invitrogen, Karlsruhe)

supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15)
hsdR17 recA1 endA1 gyrA96
thi-1 relA1 (Invitrogen, Karlsruhe)

Zelllinie

HEK-293A

HEK-293T

Mus dunni

Beschreibung

Transformierte Humane Nierenepithelzellen (human embryonic kidney), welche replikationsdefizientem Ad5 durch die Expression der E1-Genregion die Replikation erlauben. ATCC #R705-07 (Invitrogen, Karlsruhe)

Humane Nierenepithelzellen (HEK cells), welche die Ad5 E1-Genregion und das große T-Antigen des Simian Virus 40 exprimieren. ATCC #CRL-11268 (LGC Standards, Wesel)

Murine Fibroblasten-Zelllinie. Ermög-

licht die Infektion durch alle vier F-MuLV-Klassen und wird u.a. im *Infectious-Center-Assay* genutzt (Lander, M. R.; Chattopadhyay, S. K., 1984). ATCC #CRL-2017.

2.14 Viren

Alle benutzten Viren wurden durch die Arbeitsgruppe Dittmer zu Verfügung gestellt oder selbst konstruiert.

Virusstamm

Ad5.GagC+1K

Ad5.GM-CSF, Ad5.IL-12, Ad5.IL-15,
Ad5.IL-18, Ad5.IL-21

Ad5.Pol

F-MuLV

FV-B

Beschreibung

Adenoviraler Vektor, der eine modifizierte FV-Gag-Sequenz exprimiert.

Zytokin-kodierende adenovirale Vektoren (Bayer, W. et al., 2008).

Adenoviraler Vektor, der die FV-Pol-Sequenz exprimiert.

Friend Murine Leukemia Virus (F-MuLV)

Komplex aus *Friend Murine Leukemia Virus* (F-MuLV) und *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV).

2.15 Versuchstiere

Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter von 8-10 Wochen bei Versuchsbeginn verwendet. Alle Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“ durchgeführt. Zur Vakzinierung wurden die Tiere manuell fixiert, für die retroorbitale Blutentnahme mit Isofluran[®] betäubt.

Tabelle 2: Suszeptibilitätsgenotypen der verwendeten Mausstämme

Mausstamm	Hersteller
CB6F1(H2 ^{b/d} Fv1 ^{b/b} Fv2 ^{r/s} Rfv3 ^{r/s})	Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld)
C57BL/6 (H2 ^{b/b} Fv1 ^{b/b} Fv2 ^{r/r} Rfv3 ^{r/r})	Harlan Winkelmann GmbH (Borchen)
BC3F1 (H2 ^{b/k} Fv1 ^{b/b} Fv2 ^{r/s} Rfv3 ^{r/s})	Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 PCR

Präparative PCR

Die präparative PCR wurde mit dem PCR-Kit von Fermentas oder Finnzymes nach Hersteller-Angaben durchgeführt.

Standardmäßig wurden folgende Zykluseinstellungen gewählt:

- | | | |
|--------------------------------------|-------|-----------|
| • Denaturierung | 95 °C | 5:00 min |
| • Denaturierung | 95 °C | 0:30 min |
| • Annealing | 52 °C | 0:30 min |
| • Elongation | 72 °C | 1:00 min |
| • 30 Wiederholungen der Schritte 2-4 | | |
| • Elongation | 72 °C | 10:00 min |

Die Dauer der zyklischen Elongation wurde an die erwartete Fragmentgröße (30s Elongationszeit pro kb) angepasst und auf bis zu 3 min erhöht.

Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde nach dem *Two-Step-Real-Time*-Verfahren unter Zuhilfenahme einer TaqMan-Sonde mit dem *QuantiTect-Probe* RT-PCR-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Hierbei wird im ersten Schritt eine der mRNA komplementäre cDNA durch reverse Transkription hergestellt und im zweiten Schritt eine quantitative PCR durchgeführt. Die bei der PCR angelagerte TaqMan-Sonde wird während der Synthese des Gegenstranges durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut und dadurch eine Entfernung des Quenchers (signalaufhebend) vom Fluorophor (signalerzeugend) erreicht. Dies führt zu einem proportional zur DNA-Menge ansteigenden Fluoreszenzsignal.

1. cDNA-Synthese

Im ersten Schritt wurde durch reverse Transkription der viralen mRNA deren komplementäre cDNA synthetisiert. Hierzu wurden 10 µl der zuvor isolierten mRNA mit 2,5 µl des antisense-Primers für 5 min auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurde folgender Ansatz auf Eis pipettiert:

- 10 µl RT-Master
- 2,8 µl H₂O
- 1 µl TaqMan-Sonde (4 pmol/µl)
- 0,2 µl RT-Mix
- 5 µl Probe (mRNA + antisense-Primer, s.o.)

Die reverse Transkription erfolgte bei 50 °C für 20 min und wurde durch eine 5-minütige Temperaturerhöhung auf 94 °C terminiert.

2. Real-Time-PCR

In einer MicroAmp-48-Well-Reaktionsplatte wurde 1 µl des sense-Primers mit 19 µl des cDNA-Ansatzes standardmäßig nach folgendem Reaktionsschema in den Step-One-Thermocycler eingesetzt:

- | | | |
|--------------------------|------------------------------------|-----------|
| • Denaturierung | 95 °C | 15:00 min |
| • Denaturierung | 95 °C | 0:15 min |
| • Annealing & Elongation | 60 °C | 1:00 min |
| | 45 Wiederholungen der Schritte 2-4 | |
| • Kühlung | 4 °C | 0:30 min |

Die Temperaturänderungsrate lag bei 20 °C/s.

Als vergleichender Standard wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe von FV-RNA bekannter Konzentration benutzt. Zur Kontrolle wurde in den beiden oben erläuterten Schritten H₂O und mRNA bzw. cDNA einer naiven Kontrolle mitgeführt.

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenanalyse von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Herstellung des dazu benötigten Gels erfolgte mit Agarosepulver (0,8 % bzw. 2,0 %, je nach erwarteter Fragmentgröße), welches

mit TAE-Puffer aufgekocht und nach anschließender Zugabe von 0,01 % Ethidiumbromid-Lösung zum Erstarren in die Elektrophoresekammer gegeben wurde. Die Probe wurden im Verhältnis 5:1 mit Ladepuffer vermischt und neben 10 µl des Referenzmarkers (1kb-Plus-DNA-Leiter bzw. 100bp-DNA-Leiter) auf das erstarrte Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 150-240V in einer Elektrophoresekammer. Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit *Jetsorb-Gel-Extraction-Kit* der Firma Genomed nach den Herstellerangaben.

3.1.3 TA-Klonierung

Die TA-Klonierung bietet eine Möglichkeit, unabhängig von Restriktionsenzymen DNA-Fragmente ohne Überhänge mit linearisierten Vektorplasmiden zu ligieren. Durch eine Taq-Polymerase wurde (in Anwesenheit von 10mM ATP in 15 min bei 72 °C) am Matrizenstrang sequenzunabhängig ein 3'-Adenosin-Überhang erzeugt. Dieser konnte anschließend mit dem TA-Klonierungsvektor mit einfachem Thyminüberhang ligieren. Für die TA-Klonierung wurde das *TA-Cloning-Kit* von Promega nach den Herstellerangaben genutzt.

3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden standardmäßig im 20 µl-Ansatz durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl des zugehörigen Ligase-Puffers, 1 µl T4-Ligase und ein variables Verhältnis von Backbone- und Insert-DNA (meist 1:5 µl) mit H₂O aufgefüllt und in einem Reaktionsgefäß für mindestens 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.1.5 Transformation von Bakterien

Transformation chemisch kompetenter Bakterien

50 µl einer Bakteriensuspension wurden 30 min auf Eis mit 3 µl eines Plasmids inkubiert, wobei die zugegebene DNA-Menge unter 1 µg liegen musste. Die durch den folgenden 30-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C entstehenden temporären Poren ermöglichten das Einbringen der DNA in die Bakterien. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und für 1 h bei 32 bzw. 37 °C (je nach Bakterienstamm) im Thermomixer inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf Selektionsmedium ausplattiert.

Transformation elektrokompenter Bakterien

In einer eisgekühlten 2 mm-Küvette wurden 50 µl einer Bakteriensuspension mit 3 µl Plasmid-DNA versetzt. Nach der Elektroporation bei 2,5 kV wurde diese mit 200 µl SOC-Medium vermischt und auf Selektionsmedium ausplattiert.

3.1.6 Plasmid-Isolation, DNA-Restriktion und DNA-Fällung

Die DNA-Präparationen im analytischen und präparativen Maßstab (Mini- bzw. Maxi-Prep) wurden mit dem NucleoSpin-Plasmid bzw. NucleoSpin-Extract-Kit nach den Herstellerangaben durchgeführt.

DNA-Restriktionen erfolgten im 50 µl-Ansatz. Hierzu wurden 20 µl aus einer analytischen oder 10 µg aus einer präparativen DNA-Isolation mit 1 µl des Restriktionsenzym und 5 µl des zugehörigen 10fach-Puffers sowie dem Auffüllvolumen an H₂O für mindestens 1 h entsprechend den Herstellerangaben inkubiert. Zur DNA-Fällung wurden zu einem Restriktionsansatz 5 µl 3 M Natrium-Acetats gegeben und anschließend das 3-fache Probevolumen eiskalten 100%igen Ethanol. Nach Zentrifugation bei 14 000 g für 30 min wurde das Pellet mit Ethanol gewaschen und abzentrifugiert, um schließlich nach dem Trocknen in H₂O resuspendiert zu werden.

3.1.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Proben wurden in Lysepuffer lysiert, im Verhältnits 3:1 mit Lämmli-Puffer versetzt und für 15 min bei 95 °C denaturiert. Ein SDS-PAGE-Gel wurde nach folgender Zusammensetzung (s. Tabelle 3) hergestellt, wobei TEMED und APS als Starter der Polymerisierung zuletzt zugegeben wurden.

Tabelle 3: Zusammensetzung des SDS-PAGE-Gels

Substanz	Sammelgel	Trenngel
H ₂ O	1,4 ml	1,8 ml
0,5M Tris pH 6,8	2 ml	-
2M Tris pH 8,8	-	6 ml
SDS 10 %	40 µl	120 µl
APS	40 µl	120 µl
TEMED	6 µl	10 µl
Acrylamid	560 µl	4 ml

Gemeinsam mit 8 µl des *Prestained-Precision-Plus-Protein*-Markers wurden die Proben einer konstanten Spannung von 140 V für etwa 1,5 h ausgesetzt, bis die Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel trat.

Zur Überführung der während der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde das Polyacrylamidgel und eine Nitrocellulosemembran in einer dafür vorgesehenen Apparatur fixiert und eine Spannung von 100 V für 1 h angelegt. Nach mindestens 30-minütiger Inkubation in Blockpuffer wurde der Primär-Antikörper für mindestens 5 h und der Peroxidase-konjugierte Sekundär-Antikörper nach fünfmaligem Waschen mit PBS-T für mindestens 1 h mit der Membran inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran unter Zuhilfenahme des HRP-Substrates Luminol gefärbt, auf einem Film fixiert und entwickelt.

3.2 Zytologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte je nach Flaschengröße in 5 ml, 20 ml oder 50 ml des entsprechenden Mediums (DMEM für HEK-293A/T-Zellen, RPMI1640 für Mus dunni-Zellen) bei 37 °C, 5 % CO₂/Luft-Gemisch und 95 % Luftfeuchte. Im Falle vollständiger Konfluenz wurde das verbrauchte Medium dekantiert, die Zellen mit PBS gewaschen, mit 5%igen Trypsin-EDTA abgelöst und abschließend in frischem Medium resuspendiert und in Verdünnung ausgesät.

3.2.2 Bestimmung von Zellzahlen

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte nach vitalitätsindikativer Trypanblaufärbung entweder unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer oder mit dem Cellometer Auto T4.

3.2.3 DNA-Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Zellen erfolgte mit der Kalzium-Phosphat-Methode. Durch einen Überschuss an Kalziumionen bilden sich DNA-Kalziumphosphat-Kristalle, die sich auf der Zelloberfläche niederschlagen und durch Endozytose internali-

siert werden. Der genaue Mechanismus, welcher der Transfektion zugrunde liegt, ist jedoch unbekannt.

Zur Herstellung der DNA-Kalziumphosphat-Kristalle wurden 31 μl 2M CaCl_2 , 10 μg DNA und H_2O zu einem 250 μl Ansatz vermischt und im Anschluss tropfenweise mit 250 μl 2x HBS versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden subkonfluent ausplattierte Zellen in 25 cm^2 -Kulturflaschen transfiziert, ein Mediumwechsel erfolgte nach 5-12 h.

3.2.4 **Aufreinigung von Adenoviren**

Adenoviren wurden auf HEK-293A-Zellen propagiert, die Überstände von zwei bzw. fünf 300 cm^2 -Zellkulturflaschen mit den AdenoPack 20 bzw. 100-Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.5 **Titerbestimmung**

Der Adenovirus-Titer wurde mit folgenden Methoden bestimmt:

TCID₅₀

Eine den zytopathischen Effekt ausnutzende Methode zur Bestimmung des Virustiters ist die TCID₅₀ (*tissue culture infectious dose*). Dabei werden Zellen in einer 96-Loch-Platte mit einer Virusverdünnungsreihe beimpft und nach 3 Tagen der virusverursachte zytopathische Effekt beurteilt. Diejenige Dosis der Virusverdünnung, die bei der Hälfte der Vertiefungen einen zytopathischen Effekt hervorruft, wird durch den TCID₅₀-Wert angegeben und gibt Aufschluss über die Infektiosität und den Titer der Viren.

Hierzu wurde in 100 μl Medium 10 μl der Viruslösung pipettiert und diese 1:10 weiterverdünnt. Diese Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-8} wurde auf die vorbereiteten Zellen gegeben und der zytopathische Effekt nach 3 Tagen bestimmt. Für jede Verdünnung wurde der Quotient von Vertiefungen mit und ohne zytopathisch veränderten Zellen angegeben. Die TCID₅₀ wurde folgendermaßen berechnet:

$$T (\text{TCID}_{50}/10 \mu\text{l}) = 10^{1+d(S-0,5)} \quad d = \log_{10} \text{ der Verdünnung}$$

S = Summe der Quotienten.

Das Ergebnis gibt den Titer der Viruslösung in TCID₅₀ für das eingesetzte Volumen an.

Bestimmung über optische Dichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde Virusstock mit OD-Lyse-Puffer 1:9 verdünnt und für 15 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei 260 nm bestimmt und Konzentration viraler Partikel durch das Photometer ermittelt.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Vakzinierung und Belastungsinfektion

Die Vakzinierung erfolgte nach einem homologen Prime-Boost-Schema im Abstand von 3 Wochen. Dabei wurden je nach Experiment 1×10^9 , $3,5 \times 10^9$ oder 5×10^9 virale Partikel in 100 µl PBS-Lösung auf beide Hinterpfoten verteilt subkutan in die Fußsohle appliziert (Bayer, W. et al., 2008). Der schematische Ablauf kann Abb. 3.1 entnommen werden.

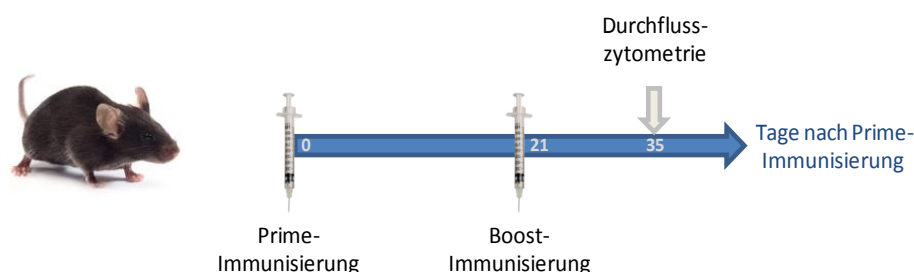


Abb. 3.1: Versuchsschema bei Analyse der Immunantwort

C57BL/6-Mäuse wurden nach einem Prime-Boost-Schema im Abstand von 3 Wochen immunisiert. 2 Wochen nach der Boostimmunisierung wurden Milzzellen extrahiert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Belastungsinfektion mit FV erfolgte 3 Wochen nach der Boost-Immunisierung in suszeptiblen CB6F1- und BC3F1-Mäusen. 10 bzw. 21 Tage später schloss sich die immunzytochemische Analyse der Viruslast mittels Virämie- und *Infectious-Center*-Assay an. Der Infektionsverlauf wurde durch die regelmäßige Palpation der Milz überwacht. Der Versuchsablauf ist in Abb. 3.2 skizziert.

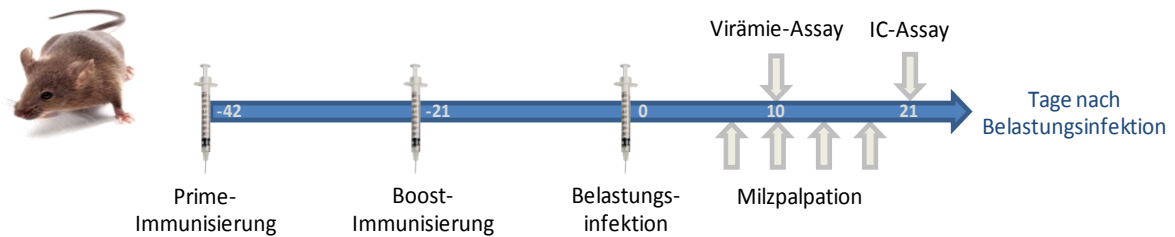


Abb. 3.2: Versuchsschema bei Schutzexperimenten

Suszeptible CB6F1- oder BC3F1-Mäuse wurden nach einem Prime-Boost-Schema im Abstand von 3 Wochen immunisiert. 3 Wochen nach der Boostimmunisierung wurden sie mit FV infiziert. 10 d p.i. erfolgte nach retroorbitaler Blutentnahme die immunzytochemische Analyse der Plasmavirusslast (Virämie-Assay). 3 Wochen nach der Infektion wurden Milzzellen extrahiert und die Viruslast immunzytochemisch bestimmt (*Infectious-Center-Assay*). Der Infektionsverlauf wurde durch Milzpalpation überwacht.

Hierbei wurden folgende FV-Dosen (angegeben in SFFU (*Spleen Focus Forming Units*)) in eine Schwanzvene injiziert:

Tabelle 4: Infektionsdosen verschiedener Mausstämme

Mausstamm	Infektionsdosis/Maus
BC3F1	10 000 SFFU
CB6F1	500 - 5 000 SFFU
C57BL/6	2 500 SFFU

3.3.2 Milzpalpation, Entnahme von Blut und Milzzellen

Zur Überwachung des FV-induzierten Krankheitsverlaufs wurde nach erfolgter Belastungsinfektion mindestens einmal wöchentlich unter Inhalations-Isofluran-Narkose die Milzgröße palpatorisch bestimmt.

Zur Charakterisierung der Plasma-Virämie wurde Mäusen 10 Tage nach der Belastungsinfektion unter Inhalations-Isofluran-Narkose ca. 200 µl retroorbitales Blut entnommen, das Plasma durch Abzentrifugation gewonnen und im heparinisierten Zustand bei - 80 °C gelagert.

Etwa 3 Wochen nach erfolgter Belastungsinfektion wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und ihre Milzen entnommen. Nach anschließendem Wiegen wurden die Milzen in eine Einzelzellsuspension überführt, wofür sie auf Metallsieben (Falcon cell strainer) zerrieben und in PBBS resuspendiert wurden. Diese Zellsuspension wurde schließlich auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt

und weiterverarbeitet oder nach nochmaliger Zentrifugation in Trizol bei - 80 °C eingefroren.

3.3.3 ***In vitro*-Proliferationsassay**

Zur Evaluierung der Antigenprozessierung wurde ein *in vitro*-Proliferationsassay herangezogen. Hierzu wurden dendritische Zellen mit adenoviralen Vektoren, welche ein FV-Epitop exprimieren, infiziert. Letztgenanntes wird in der dendritischen Zelle prozessiert und anschließend auf MHC-I-Molekülen präsentiert. Nach Kokultivierung der dendritischen Zellen mit CFSE-gefärbten, Epitop-spezifischen CD8⁺ CTL aus T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen werden diese stimuliert und zur Proliferation angeregt. Hierdurch nimmt die CFSE-Intensität der Epitop-spezifischen CTL ab, was durchflusszytometrisch nachweisbar ist.

Zunächst wurden 10⁵ dendritische Zellen des Knochenmarks von C57BL/6-Mäusen mit adenoviralen Vektoren (MOI 1 000) oder mit FV-Peptid für 3h bei 37°C inkubiert. CD8⁺ CTL aus Milzen T-Zell-Rezeptor-transgener Mäuse (Ohlen, C., 2002) wurden per Auto-MACS-System isoliert, mit 1 µM CFSE gefärbt und anschließend mit AIM-V-Medium sowie 5 % FCS versetzt. Im Folgenden wurden 2x10⁴ infizierte dendritische Zellen mit 5x10⁴ CD8⁺ CTL in AIM-V-Medium für 2-3 Tage im Brutschrank koinkubiert. Abschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der CFSE-Intensität der CD8⁺ CTL.

3.3.4 **Bestimmung der Viruslast**

3.3.4.1 **Virämie-Assay**

Die Bestimmung der Virämie erfolgte anhand von Blutproben, die 10 Tage nach der Belastungsinfektion entnommen wurden (s. Abschnitt 3.3.2), durch eine Antikörperfärbung mit Substratreaktion. Das Plasma wurde mittels Zentrifugation gewonnen. Danach wurde in einer 96-Loch-Platte eine Verdünnungsreihe erstellt.

Am Vortag wurden Mus dunni-Zellen in einer 24-Loch-Platte ausplattiert und nach dem Anwachsen mit 2,5 µl Polybrenlösung (800 µg/ml) inkubiert, welche eine bessere Bindung der freien Viren an die Zelloberfläche mediiert. Anschlie-

ßend wurden 50 µl der Plasma-Verdünnungen auf die Zellen gegeben und diese nach etwa 3-4 Tagen bei erreichter Konfluenz mit Ethanol fixiert.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS + 0,1 % BSA erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper AK720 (200 µl/Vertiefung) für mindestens 30 min bei Raumtemperatur. AK720 bindet an das Env-gp70 von F-MuLV. Nachdem erneut gewaschen worden war, konnte die Platte mit 200 µl des 1:300 verdünnten Zweitantikörpers Ziege- α -Maus-HRP ebenfalls für mindestens 30 min inkubiert werden. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen 10-15 min mit je 0,5 ml AEC-Gebrauchslösung und H₂O₂ gefärbt, erkennbare Foci gezählt und die Anzahl fokusbildender Einheiten (*Focus Forming Units*, FFU) pro ml Plasma berechnet.

3.3.4.2 IC-Assay

Der *Infectious-Center-Assay* (IC-Assay) beruht auf der Detektion virusinfizierter Zellen, die durch Zell-Zell-Kontakte Nachbarzellen infizieren und so erkennbare Foci in einer Antikörper-Substratreaktion hervorrufen.

Für den IC-Assay wurden am Vortag ausgesäte Mus dunni-Zellen in 6-Loch-Platten mit einer Verdünnungsreihe von zuvor hergestellter Milzzellsuspension (s. Abschnitt 3.3.2) koinkubiert. Die Verdünnung wurde in einer 24-Loch-Platte hergestellt, indem in den ersten Vertiefungen 1,8 ml RPMI-Medium mit 200 µl Milzzellsuspension (10^8 Zellen / ml) vorgelegt und sequenziell 1:10 weiterverdünnt wurden, wodurch Verdünnungsstufen von 10^7 bis 10^2 Zellen entstanden.

Nach einer Inkubation bis zur Konfluenz wurden die Zellen fixiert und wie oben beschrieben gefärbt (s. Abschnitt 3.3.4.1). Aus der Zahl der erkennbaren Foci wurde die Viruslast als infektiöse Zentren pro 10^8 Milzzellen begerechnet.

3.3.4.3 Isolierung viraler RNA und Quantitative PCR

Isolierung viraler RNA

2×10^7 murine Milzzellen wurden in 200 µl Trizol aufgenommen und bei - 80 °C eingefroren. Zur RNA-Isolierung wurden 40 µl Chloroform zur aufgetauten Probe gegeben und diese kräftig geschüttelt. Nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 12 000 g und 2-8 °C wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und 100 µl Isopropanol hinzugefügt, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 12 000 g und 2-8 °C wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 200 µl 75%igem Ethanol gewaschen, 5 min bei 7 500 g und 2-8 °C zentrifugiert und das RNA-Pellet 5-10 min luftgetrocknet. Schließlich wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem, destilliertem H₂O resuspendiert, 10 min bei 55-60 °C inkubiert und dann weiter verwendet oder bei - 80 °C aufbewahrt.

Quantitative PCR

Die quantitative PCR erfolgte wie in 3.1.1 beschrieben.

3.3.5 Bestimmung der zellulären Immunantwort

Die zelluläre Immunantwort wurde in C57BL/6 bestimmt, da diese eine starke Immunantwort gegen FV aufweisen. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Effektormoleküle mit Antikörpern gefärbt und die Zellen entsprechend charakterisiert. Zum Ausschluss toter Zellen wurden diese mit Propidiumiodid oder *Fixable Viability Dye* (FVD; bei Intrazellulärfärbungen) markiert.

3.3.5.1 Tetramer- und Oberflächenfärbung

Die Färbung mit MHC-Klasse-I-Tetrameren ermöglicht eine selektive Erfassung antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen. Das Funktionsprinzip ist in Abb. 3.3 dargestellt. Für die selektive Färbung FV-spezifischer CTL wurden Tetramere verwendet, welche eine modifizierte Version des Gag_{L85-93}-Epitops als Peptid enthalten (Schepers, K. et al., 2002).

Für die Tetramerfärbung wurden etwa $2,5 \times 10^6$ Milzzellen in einer 96-Loch-Platte mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit MHC-I-AbuAbuLAbuLTVFL-Tetramer (1 µl), αCD8 (0,25 µl), αCD43 (0,25 µl) und anderen Antikörpern sowie dem Lebend-Tot-Farbstoff FVD (0,25 µl) in einem 50 µl-FACS-Puffer-Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit gefärbt. Nach nochmaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

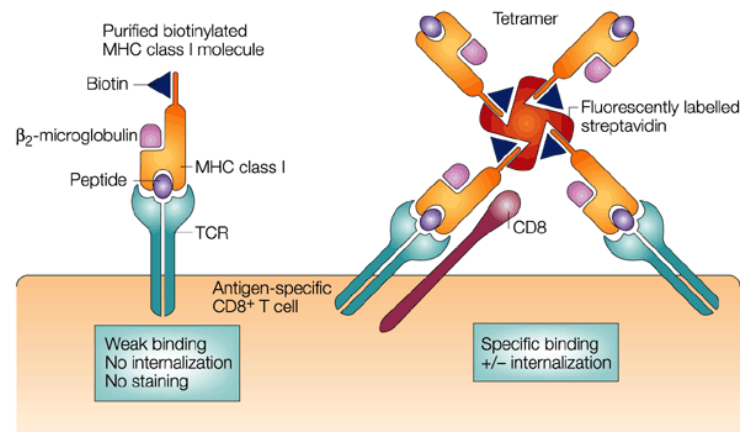


Abb. 3.3: Aufbau und Funktion von MHC-I-Tetrameren

Vier mit einem Peptid (z.B. einem viralen Epitop) beladene, rekombinante MHC-I-Moleküle sind kovalent über Biotin-Reste an ein zentrales Streptavidinmolekül gebunden, wodurch die Spezifität im Vergleich zu isolierten MHCs deutlich erhöht wird (Constantin, C. M. et al., 2002). Nach der Anheftung der Tetramere an die entsprechenden Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptoren ermöglicht ein an das Streptavidin gekoppeltes, fluoreszierendes Markermolekül schließlich die durchflusszytometrische Darstellung. Modifizierte Abbildung nach Klenerman (Klenerman, P. et al., 2002).

3.3.5.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Zum Nachweis der Funktionalität spezifischer $CD8^+$ CTL wurden diese unter Zuhilfenahme eines virusspezifischen Peptids stimuliert und ihre Zytokinproduktion durchflusszytometrisch nach vorhergehender Intrazellulärfärbung bestimmt. Die spezifische Stimulation der Zellen erfolgte in einer 96-Loch-Platte mit jeweils 0,065 μ l AbuAbuLAbuLTVFL-Peptid und 0,04 μ l Brefeldin A sowie R10-Medium in einem 100 μ l-Ansatz für 6 h. Anschließend wurde die Intrazellulärfärbung durchgeführt. Bei der Granzym-B-Messung wurde in unstimulierten Zellen nach der gleichen Prozedur verfahren.

Die Färbung intrazellulärer Komponenten durch Antikörper erfordert die vorhergehende Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Nach einer Oberflächenfärbung (s. Abschnitt 3.3.5.1) wurden diese Voraussetzung durch die Anwendung des Cytofix/Cytoperm-Kit entsprechend der Herstellerangaben geschaffen und die Zellen mit je 0,25 μ l α -IFN γ -, α -TNF α -, α -IL-2- und α -GzmB-Antikörpern in 50 μ l PermWash-Puffer gefärbt. Nach zweimaligem Waschen in PermWash-Puffer wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch erfasst.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung rekombinanter Impfvektoren

Die Herstellung der replikationsdefizienten, rekombinanten adenoviralen Impfvektoren, welche die retrovirale Pol-Sequenz beinhalteten, erfolgte im Wesentlichen in vier Schritten:

Zu Beginn musste die Pol-Sequenz aus dem pBR322-FB29-Plasmid herausamplifiziert werden. Dieses besteht aus pBR322, einem der ersten künstlich hergestellten Plasmide, und FB29, einem besonders virulenten FV-Isolat (Perryman, S. et al., 1991). Im zweiten Schritt wurden über einen Klonierungsvektor homologe Rekombinationsarme eingeführt, welche die anschließende Rekombination des Shuttle-Vektors mit dem pAdEasy-Plasmid und somit letztlich die Einführung des retroviralen Transgens in den adenoviralen Impfvektor ermöglichte. Letztgenannter wurde im letzten Schritt durch Transfektion von HEK-293-Zellen erhalten und vermehrt (s. Abb. 4.1).

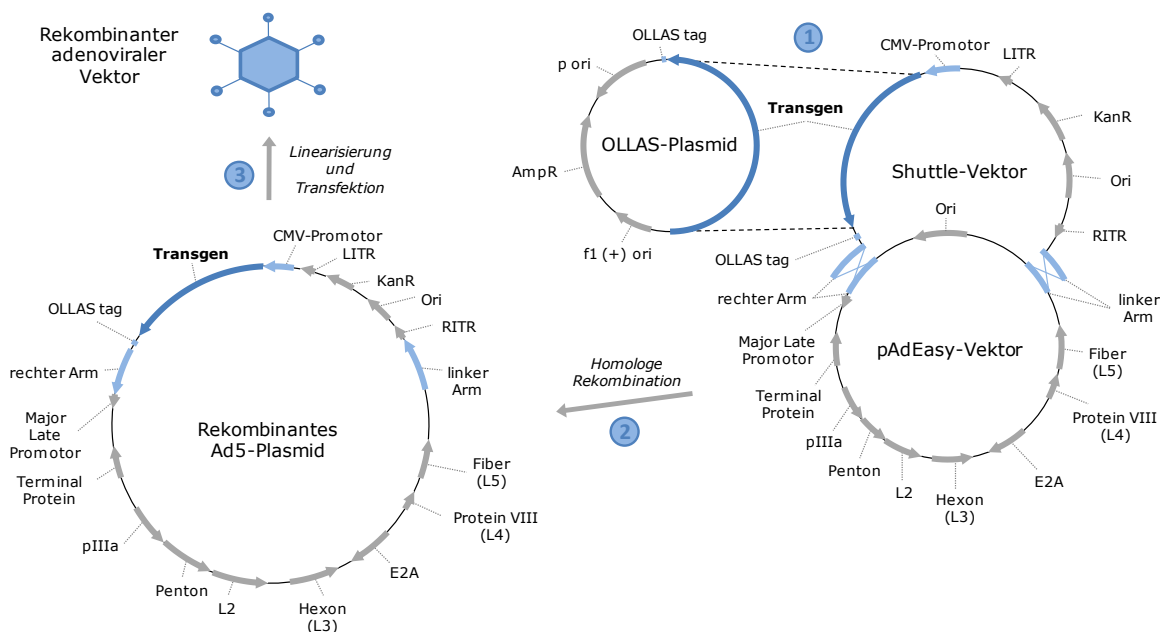


Abb. 4.1: Schematische Übersicht des AdEasy™-Systems

Nach der Klonierung der retroviralen Ausgangssequenz in ein OLLAS-Plasmid und anschließend in den Shuttle-Vektor (1) erfolgte per homologer Rekombination der Transfer des Transgen in ein rekombinantes Ad5-Plasmid (2). Nach Linearisierung und Transfektion von HEK-Zellen kam es schließlich zur Synthese infektiöser adenoviraler Impfvektoren (3). AmpR: Ampicillin-Resistenz; E: Early Antigen; KanR: Kanamycin-Resistenz; L: Late Antigen; LITR/RITR: Left/Right Inverted Terminal Repeat; OLLAS: Markersequenz; Ori: Origin of Replication.

Über die Klonierung von Pol in pBelOLLAS wurde unmittelbar hinter der Pol-Sequenz ein OLLAS *tag* (Markersequenz) eingeführt, welches im Western Blot mit dem korrespondierenden Antikörper eine Detektion und damit den Nachweis der Expression der Sequenz ermöglichte. Dies war nötig, da kein direkt gegen F-MuLV Pol gerichteter Antikörper zur Verfügung stand.

Zur Einführung der Pol-Sequenz in den adenoviralen Impfvektor wurde das AdEasy™-System genutzt, das ein von Ad5 abgeleitetes Impfvektorplasmid und ein Rekombinationsplasmid für den Transfer der Zielsequenz beinhaltet. Durch die Klonierung der Pol-Sequenz aus pBelPolOLLAS in das Transferplasmid pShuttle-CMV wurde das Pol-Konstrukt unter anderem mit einem CMV-Promotor und zwei homologen Rekombinationsarmen versehen. Der CMV-Promotor bedingte eine starke Expression der Transgenkassette (He, T. C. et al., 1998), während die Rekombinationsarme die anschließende homologe Rekombination mit pAdEasy-1 zu dem adenoviralen Impfvektorplasmid pAd5.Pol ermöglichten. Die Rekombination erfolgte nach Elektroporation in BJ5183-Bakterien.

Um die Korrektheit der klonierten Plasmide zu validieren, wurde nach jedem Klonierungsschritt eine Restriktionsanalyse durchgeführt, anhand derer die entsprechenden Konstrukte für die weiteren Arbeitsschritte ausgewählt wurden. Darüber hinaus wurde das Transfektionsplasmid pAd5.Pol abschließend einer Sequenzierung unterzogen (LGC Genomics, Berlin) und so dessen Integrität bestätigt. Ferner wurde die Transgenexpression der pAd5.Pol-Konstrukte nach einer Transfektion von HEK-293T-Zellen evaluiert. Diese Zelllinie erlaubt durch die Einführung des großen T-Antigens des *Simian Virus* 40 eine starke episomale Expression des transfizierten Plasmids und damit ein stärkeres Proteinsignal im Western Blot (Vargas, J. et al., 2004). Das Gag/Pol-Vorläuferprotein wurde durch die virale Protease in seine funktionellen Untereinheiten – Protease, Reverse Transkriptase und Integrase – gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zelllysate pAd5.Pol-transfizierter HEK-Zellen wurde das im Western Blot entstandene Bandenmuster mit dem des Shuttlevektors abgeglichen und stimmte mit diesem in den relevanten Bereichen für einen Ad5.Pol-Klon überein (s. Abb. 4.2).

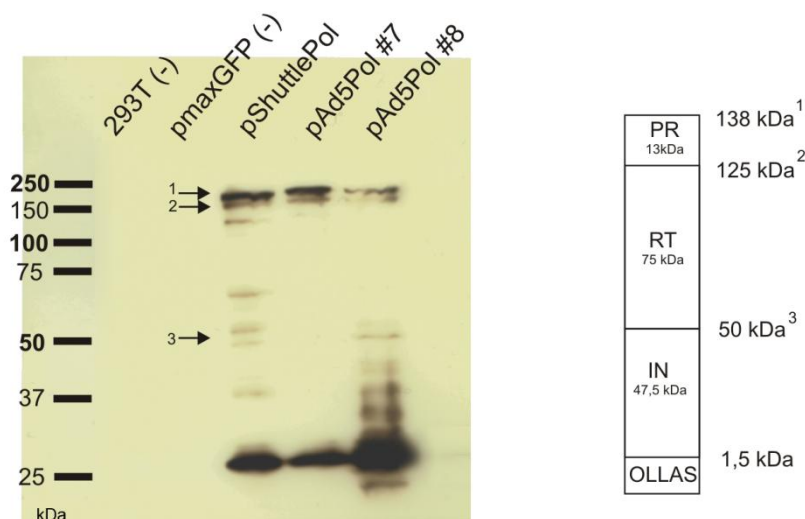


Abb. 4.2: Expression von pAd5.Pol durch HEK 293T-Zellen im Western Blot

HEK 293T-Zellen wurden mit zwei verschiedenen pAd5.Pol-Klonen sowie dem Transferplasmid pShuttlePol transfiziert. Untransfizierte (293T) sowie mit pMaxGFP transfizierte 293T-Zellen dienten als Negativkontrollen. Der abgebildete Western Blot zeigte ein komplexes Bandenmuster, das vermutlich durch eine zusätzliche Spaltung und unspezifische Antikörperfärbung zellulärer Proteine zustande kam. Die relevanten Banden für die Spaltprodukte des GagPol-Vorläuferproteins (1-3) waren jedoch für den Klon pAd5.Pol#8 deutlich nachweisbar. PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; IN: Integrase; OLLAS: Markersequenz.

In HEK-293A-Zellen entwickelten sich anschließend nach der Transfektion mit dem Plasmid pAd5.Pol die infektiösen Impfviren. Die Anzüchtung und Vermehrung der replikationsdefizienten Adenoviren wurde durch eine Expression der für die Virusreplikation essentiellen E1-Genprodukte durch HEK-293-Zellen möglich (He, T. C. et al., 1998).

4.2 Evaluation F-MuLV Pol-kodierender Impfvektoren

Nach der Herstellung und Aufreinigung der rekombinanten Impfviren Ad5.Pol wurden diese nun *in vivo* auf ihre Fähigkeit eine Immunantwort zu generieren getestet. Angesichts des Einflusses unterschiedlicher MHC-Allele auf die Präsentation viraler Antigene und damit auf den zu erwartenden Impferfolg wurden für die Experimente unterschiedliche Mausstämme verwendet. Die Dosen für Belastungsinfektionen mit FV-B wurden den Mausstämmen entsprechend angepasst (vgl. Tabelle 1).

Zur Bestimmung der Immunantwort wurden C57BL/6-Mäuse aufgrund ihrer stärkeren Immunantwort verwendet. Die Belastungsinfektionen wurden zu-

sätzlich in hochsuszeptiblen CB6F1- bzw. intermediär suszeptiblen BC3F1-Mäusen durchgeführt. Zur Beurteilung des Impfschutzes wurden je 5 Tiere der verschiedenen Mausstämme in einem homologen Prime-Boost-Schema mit 5×10^9 VP/Maus zweimal im Abstand von 3 Wochen durch Injektionen in die Plantarseite der Hinterpfoten geimpft. Die Belastungsinfektion erfolgte 3 Wochen nach der Boost-Immunisierung durch die intravenöse Injektion von FV-B (vgl. Abb. 3.2). Zur Evaluation des Impferfolges wurde die Viruslast in Milz und Plasma immunzytochemisch sowie durch RT-PCR analysiert.

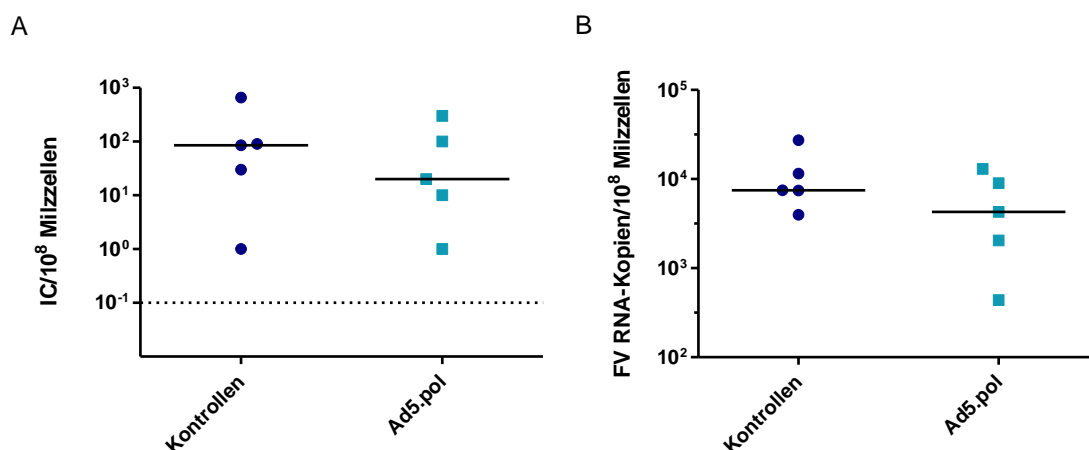


Abb. 4.3: Viruslast Ad5.Pol-vakzinierter C57BL/6-Mäuse.

C57BL/6-Mäuse wurden zweimalig im Abstand von 3 Wochen durch plantare Injektionen in die Hinterpfoten mit je 5×10^9 VP Ad5.Pol geimpft. 21 Tage nach der Boost-Immunisierung wurden die Tiere intravenös mit 2500 SFFU FV-B belastet und die Milzzellen 21 d p.i. analysiert. (A) zeigt die Viruslast der Milz im IC-Assay, (B) die Zahl viraler RNA-Kopien bezogen auf 10^8 Milzzellen. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Rangsummen-Test ($P > 0,05$).

In C57BL/6-Mäusen ($H2^{b/d} Fv1^{b/b} Fv2^{r/s} Rfv3^{r/s}$), die als resistent gegenüber der FV-induzierten Erkrankung gelten, zeigte sich im IC-Assay nach Prime-Boost-Immunisierung und anschließender intravenöser Belastung mit 2500 SFFU FV-B (vgl. Abb. 3.1) keine signifikante Reduktion der Viruslast von Ad5.Pol-geimpften gegenüber unvakzinierten Tieren (s. Abb. 4.3A). Dieses Ergebnis wurde durch eine RT-PCR-Analyse von Milzzellen bestätigt (s. Abb. 4.3B).

Anschließend wurden hochsuszeptible CB6F1-Mäuse ($H2^{b/d} Fv1^{b/b} Fv2^{r/s} Rfv3^{r/s}$) durch eine Prime-Boost-Immunisierung mit Ad5.Pol geimpft und mit je 500 SFFU FV-B infiziert. In der Frühphase der Infektion 10 d p.i. wiesen sie keine geringere Plasmaviruslast als unvakzinierte Kontrolltiere auf und auch im wei-

teren Infektionsverlauf zeigte sich keine signifikante Reduktion der Viruslast in den isolierten Milzzellen gegenüber Kontrolltieren (s. Abb. 4.4).

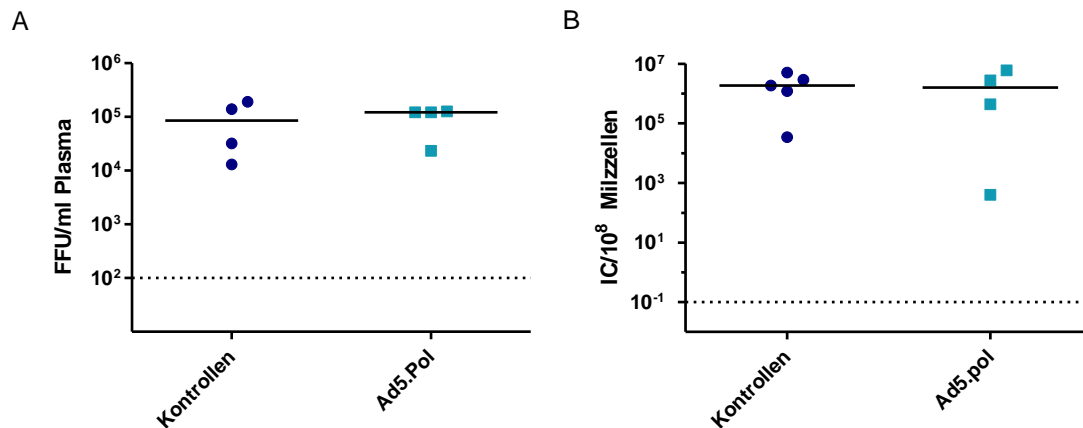


Abb. 4.4: Viruslast Ad5.Pol-vakzinierter CB6F1-Mäuse.

CB6F1-Mäuse wurden zweimalig im Abstand von 3 Wochen mit je 5×10^9 VP Ad5.Pol in die Hinterpfoten geimpft. 21 Tage nach der Boost-Immunisierung wurden die Tiere intravenös mit 500 SFFU FV-B infiziert. (A) Die Plasmaviruslast wurde 10 d p.i. im Virämie-Assay bestimmt. (B) 21 d p.i. wurde im IC-Assay die Viruslast der Milzzellen ermittelt. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's t-Test ($P > 0,05$).

Auch in Mäusen des intermediär suszeptiblen BC3F1-Stammes ($H2^{b/k}$ $Fv1^{b/b}$ $Fv2^{r/s}$ $Rfv3^{r/s}$), die nach dem gleichen Schema immunisiert und mit 10 000 SFFU FV-B/Maus belastet wurden, zeigte sich keine signifikante Reduktion der Viruslast gegenüber unvakzinierter Kontrolltieren (s. Abb. 4.5).

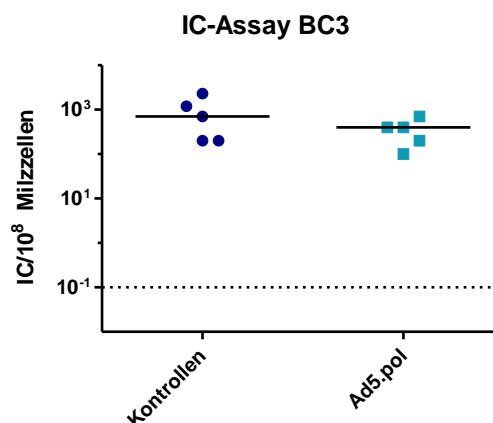


Abb. 4.5: Viruslast Ad5.Pol-vakzinierter BC3F1-Mäuse.

BC3F1-Mäuse wurden zweimalig im Abstand von 3 Wochen mit je 5×10^9 VP Ad5.Pol in die Hinterpfoten geimpft. 21 Tage nach der Boost-Immunisierung wurden die Tiere intravenös mit 10 000 SFFU FV-B belastet und die Viruslast der Milz 21 d p.i. im IC-Assay analysiert. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's t-Test ($P > 0,05$).

Insgesamt konnte die Ad5.Pol-Vakzine in keinem der getesteten Mausstämme unterschiedlicher Haplotypen eine signifikante Verbesserung des Impferfolgs zeigen. Die dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass die Pol-Sequenz des FV keine relevanten Epitope aufweist.

4.3 Verbesserung der Epitopprozessierung durch Modifikation der Gag-Sequenz

Das bisher einzige nachgewiesene CD8⁺ CTL-Epitop des FV ist in der sogenannten *Leader Region* des Gag-Polypeptids (GagL) lokalisiert. Dieses entsteht durch die Nutzung eines alternativen Startcodons, wodurch an das Polyprotein p65^{gag} etwa 100 zusätzliche Aminosäuren angehängt werden und nach Glykosylierung das Glykoprotein gp80^{gag} gebildet wird (Chen, W. et al., 1996). Bis zu 10 % aller aktivierten CD8⁺ T-Zellen sind in der akuten FV-Infektion spezifisch für dieses MHC H-2D^b-restringierte Epitop GagL₈₅₋₉₃ (Zelinsky, G. et al., 2006). Adenovirale Vektoren und Plasmide, welche dieses Leader-Gag exprimierten, konnten jedoch keine GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ CTL-Antworten induzieren (Bayer, W. et al., 2008; Dittmer, U. et al., 2008), was von der mangelhaften Prozessierung des Epitops herrühren könnte. Zu deren Verbesserung wurde durch eine Modifikation am C+1-Terminus der GagL₈₅₋₉₃-Sequenz ein Tyrosin- durch einen Lysinrest substituiert, da basische Aminosäuren als vorteilhaft für die Antigenprozessierung beschrieben wurden (Pamer, E.; Cresswell, P., 1998; Livingston, B. D. et al., 2001).

Durch *Overlap-Extension-PCR* wurde die für die flankierende Aminosäure kodierende Sequenz entsprechend modifiziert, das erhaltene GagC+1K in pShuttle kloniert und anschließend durch homologe Rekombination in einen adenoviralen Vektor eingeführt. Die Integrität der so erhaltenen Impfviren wurde per Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) sowie durch eine Western-Blot-Analyse von Zelllysaten zuvor infizierter HEK 293T-Zellen geprüft. Abb. 4.6 verdeutlicht schematisch die durchgeführte Veränderung der GagL-Sequenz.

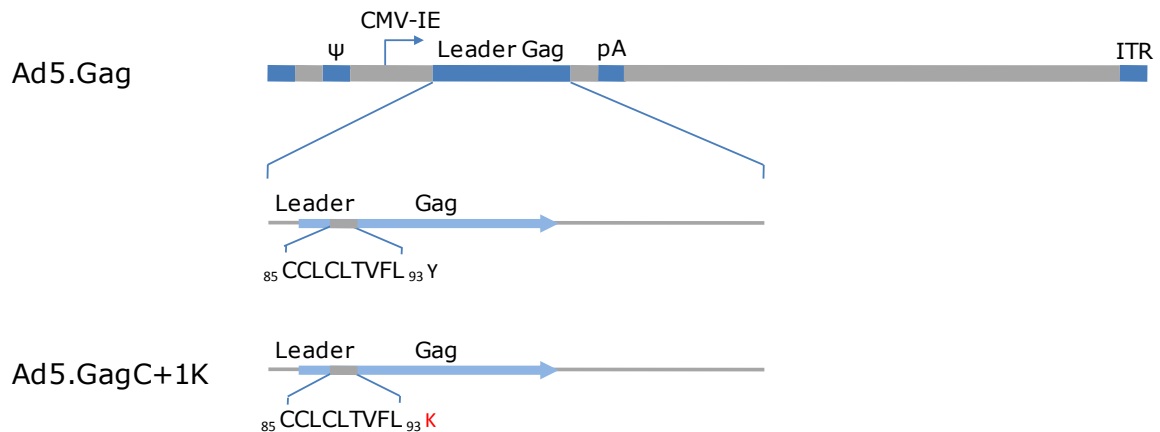


Abb. 4.6: Schematische Darstellung des Ad5.GagC+1K-Vektors

Die Abbildung verdeutlicht den Aufbau und die Position der modifizierten Leader Gag-Sequenz innerhalb des adenoviralen Impfvektors. Am C-Terminus wurde ein das Gag_{L85-93} Epitop (CCLCLTVFL) flankierender Tyrosin- durch einen Lysinrest substituiert (rot dargestellt). Ψ : Verpackungssignal; CMV-IE: CMV *Immediate Early Promotor*; pA: Polyadenylierungssignal; ITR: *Inverted Terminal Repeat*.

Zur Evaluation der Antigenprozessierung und -präsentation wurde mit dem so konstruierten rekombinanten Impfvektor Ad5.GagC+1K anschließend ein *in vitro*-Proliferationsassay durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.3). Mit Ad5.GagC+1K infizierte dendritische Zellen erhöhten die Proliferationsrate Gag_{L85-93}-spezifischer CTL, wohingegen Ad5.Gag keine Proliferation hervorrief (s. Abb. 4.7).

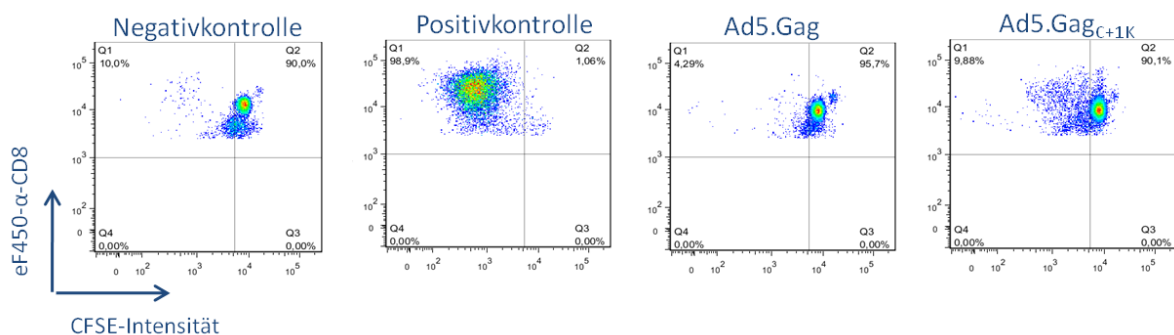


Abb. 4.7: *In vitro*-Proliferationsassay

Dendritische Zellen wurden mit adenoviralen Vektoren infiziert, welche die retroviralen Sequenzen Gag bzw. GagC+1K kodieren. Nach Expression, Prozessierung und Präsentation der entsprechenden Antigene durch die dendritischen Zellen wurden letztgenannte mit Gag_{L85-93}-spezifischen, CFSE-gefärbten CD8⁺ CTL kokultiviert. Die durchflusszytometrisch bestimmte Abnahme der CFSE-Intensität spiegelt die Proliferationszunahme spezifisch stimulierter CD8⁺ CTL wider. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte, als Positivkontrolle Peptid-beladene dendritische Zellen. Die dargestellten Plots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Für die anschließenden *in vivo*-Analysen wurden hochsuszeptible CB6F1-Mäuse nach einem Prime-Boost-Schema zweimal mit je 1×10^9 VP immunisiert (vgl. Abb. 3.1) und die Immunantworten entnommener Blutzellen anschließend durchflusszytometrisch bestimmt.

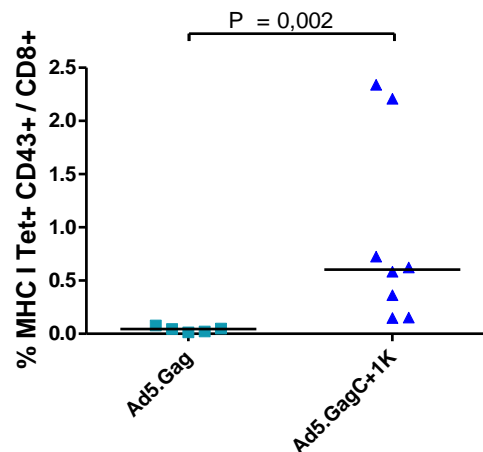


Abb. 4.8: Anteil aktivierter Epitop-spezifischer CD8⁺ CTL im Blut Ad5.GagC+1K-vakzinierter CB6F1-Mäuse

CB6F1-Mäuse wurden mit je 1×10^9 VP Gag bzw. GagC+1K-kodierenden Ad5-Vektoren mit einer Prime-Boost-Impfung im Abstand von 3 Wochen durch plantare Injektionen in die Hinterpfoten immunisiert. 14 Tage nach der Boost-Immunisierung wurden Blutzellen entnommen und durchflusszytometrisch charakterisiert. Die Abbildung zeigt den Anteil aktivierter Epitop-spezifischer Zellen an der Gesamtzahl aller CD8⁺ CTL. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Rangsummen-Test (P=0,002).

Der Anteil aktivierter Epitop-spezifischer CD8⁺ CTL an der Gesamtheit aller CD8⁺ CTL im Blut vakzinierter Mäuse war für Ad5.GagC+1K signifikant höher als bei jenen Tieren, die mit der unmodifizierten Gag-Sequenz geimpft worden waren (s. Abb. 4.8).

In einem Belastungsexperiment wurde Ad5.GagC+1K hinsichtlich seiner immunprotektiven Wirkung untersucht. 3 Wochen nach abgeschlossener Prime-Boost-Immunisierung mit 5×10^9 VP Ad5.Gag bzw. Ad5.GagC+1K wurden hierzu CB6F1-Mäuse mit 5 000 SFFU FV-B infiziert. Aus Abb. 4.9A wird ersichtlich, dass durch eine Immunisierung mit der unmodifizierten Gag-Sequenz keine signifikante Reduktion der Viruslast erreicht wurde. Die Plasmaviruslast Ad5.GagC+1K-geimpfter Tiere konnte jedoch unter die Nachweisgrenze des Virämie-Assays gesenkt werden und war damit signifikant niedriger als bei unvakzinierten oder Ad5.Gag-immunisierten Mäusen. Auch in der Milz konnte der

GagC+1K-Vektor die Viruslast gegenüber den Vergleichsgruppen signifikant senken (s. Abb. 4.9).

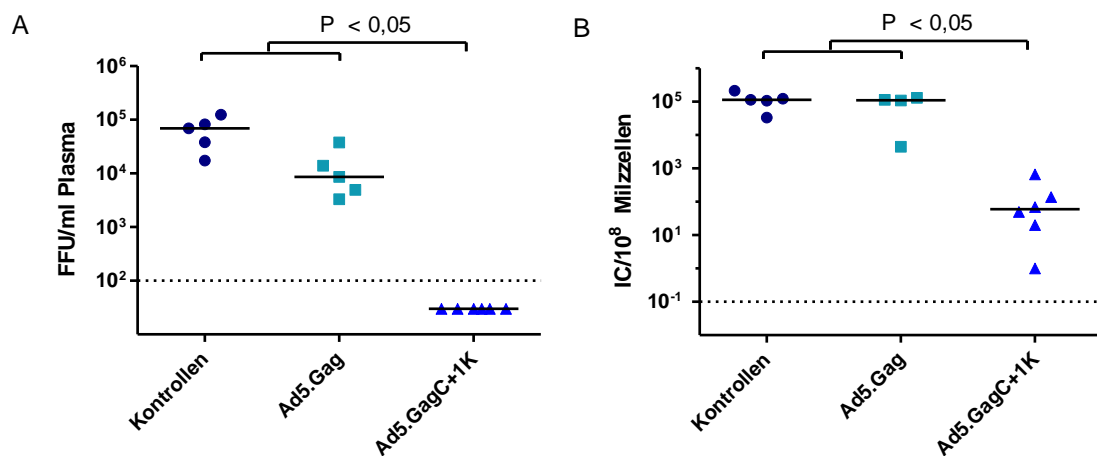


Abb. 4.9: Viruslast Ad5.GagC+1K-vakzinierter CB6F1-Mäuse

CB6F1-Mäuse wurden zweimalig im Abstand von 3 Wochen mit je 5×10^9 VP Ad5.Gag bzw. Ad5.GagC+1K immunisiert. 21 Tage nach der Boost-Immunisierung wurden die Tiere intravenös mit 5000 SFFU FV-B infiziert. (A) Die Plasmaviruslast wurde 10 d p.i. im Virämie-Assay bestimmt. (B) 21 d p.i. wurde im IC-Assay die Viruslast der Milzzellen ermittelt. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Dunn-Test.

4.4 Einfluss einer Zytokin-Koexpression auf den Impferfolg

Die Koexpression von T_H1-Zytokinen wie GM-CSF, IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21 konnte bei Peptid- und DNA-Immunisierungen die CTL-Antwort und Sekretion weiterer T_H1-Zytokine in einigen Mausstämmen steigern (Ahlers, J. D., 2001; Bolesta, E. et al., 2006; Billaut-Mulot, O. et al., 2001). Zur weiteren Verbesserung der Vakzinierungsergebnisse sollte daher der immunmodulierende Einfluss einer Koadministration T_H1-Zytokin-kodierender adenoviraler Vektoren evaluiert werden.

Hierzu wurden je 1×10^9 VP/Maus der Ad5-basierten Zytokin-Vektoren und des GagC+1K-kodierenden Ad5-Vektors im Abstand von 3 Wochen sowohl in der Prime- als auch in der Boost-Immunisierung koappliziert. Um eine vergleichbare Anzahl an Viruspartikeln in den nur mit Ad5.Gag bzw. Ad5.GagC+1K geimpften Kontrolltieren sicherzustellen, wurde diesen die gleiche Dosis eines GFP-exprimierenden Ad5-Vektors injiziert.

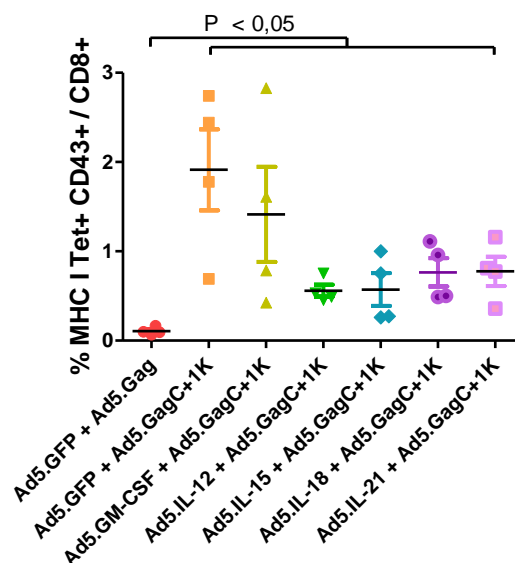


Abb. 4.10: Einfluss der Zytokin-Koexpression auf den Anteil aktivierter Epitop-spezifischer CD8⁺ CTL

C57BL/6 Mäuse wurden mit je 1×10^9 VP Gag- bzw. GagC+1K-kodierenden Ad5-Vektoren sowie Ad5-basierenden Vektoren, welche die T_H1-Zytokine GM-CSF, IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21 und GFP exprimieren, mittels Prime-Boost-Impfung im Abstand von 3 Wochen durch plantare Injektionen in die Hinterpfoten koimmunisiert. 14 Tage nach der Boost-Immunisierung wurden zuvor entnommene Milzzellen durchflusszytometrisch charakterisiert. Die Abbildung zeigt den Anteil aktivierter Epitop-spezifischer Zellen an der Gesamtzahl aller CD8⁺ CTL. Die statistische Auswertung erfolgte per One-Way-ANOVA (Analysis of Variance) mit Student-Newman-Keuls-Test.

Zunächst wurde eine Charakterisierung der Immunantwort in C57BL/6-Tieren durchgeführt. Zwei Wochen nach der Boost-Immunisierung wurde der Anteil Epitop-spezifischer CD8⁺ CTL an allen Milzzellen und deren intrazelluläres Effektormolekülprofil hinsichtlich der Produktion von GzmB, IFN- γ und TNF- α analysiert.

Die Milzen Ad5.GagC+1K/GFP-geimpfter C57BL/6-Mäuse wiesen im Vergleich zu den Ad5.Gag/GFP-Kontrollen abermals einen signifikant erhöhten Anteil aktivierter Epitop-spezifischer CTL auf, die Koimmunisierung mit Zytokin-kodierenden Vektoren ergab jedoch keine weitere Verbesserung der Epitop-spezifischen Immunantwort (s. Abb. 4.10; $P > 0,05$). Ungeachtet dessen zeigte sich jedoch für die Koimmunisierung mit Ad5.IL-15 ein signifikant erhöhter Anteil GzmB-positiver Zellen an der Gesamtzahl aller aktivierten CD8⁺ CTL gegenüber den mit Ad5.GagC+1K/GFP-vakzinieren Mäusen (s. Abb. 4.11).

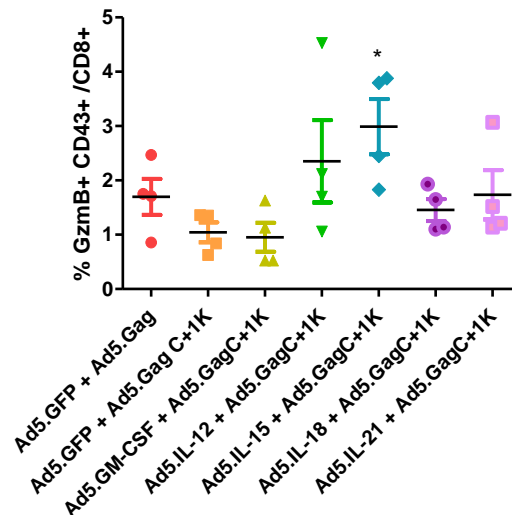


Abb. 4.11: Einfluss der Zytokin-Koexpression auf den Anteil GzmB-produzierender Milzzellen

C57BL/6 Mäuse wurden mit je 1×10^9 VP Ad5.Gag bzw. Ad5.GagC+1K sowie Ad5-basierenden Vektoren, welche die Th1-Zytokine GM-CSF, IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21 sowie GFP exprimieren, mit einer Prime-Boost-Impfung im Abstand von 3 Wochen durch plantare Injektionen in die Hinterpfoten koimmunisiert. 14 Tage nach der Boost-Immunisierung wurden Milzzellen durchflusszytometrisch charakterisiert. Abgebildet ist der Anteil GzmB-produzierender aktivierter Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ CTL. * = signifikant höher als Ad5.GagC+1K + Ad5.GFP ($P=0,043$). Die statistische Auswertung erfolgte per One-Way-ANOVA (Analysis of Variance) mit Student-Newman-Keuls-Test.

Die Produktion von IFN- γ und TNF- α fiel dagegen bei zusätzlicher Zytokinexpression auch für IL-15 nicht höher aus, es wurden allerdings für die Ad5.GagC+1K-Konstrukte signifikant höhere Werte im Vergleich zu Ad5.Gag gemessen (s. Abb. 4.12). Diese Effekte waren in weiteren Versuchen reproduzierbar (Daten nicht gezeigt).

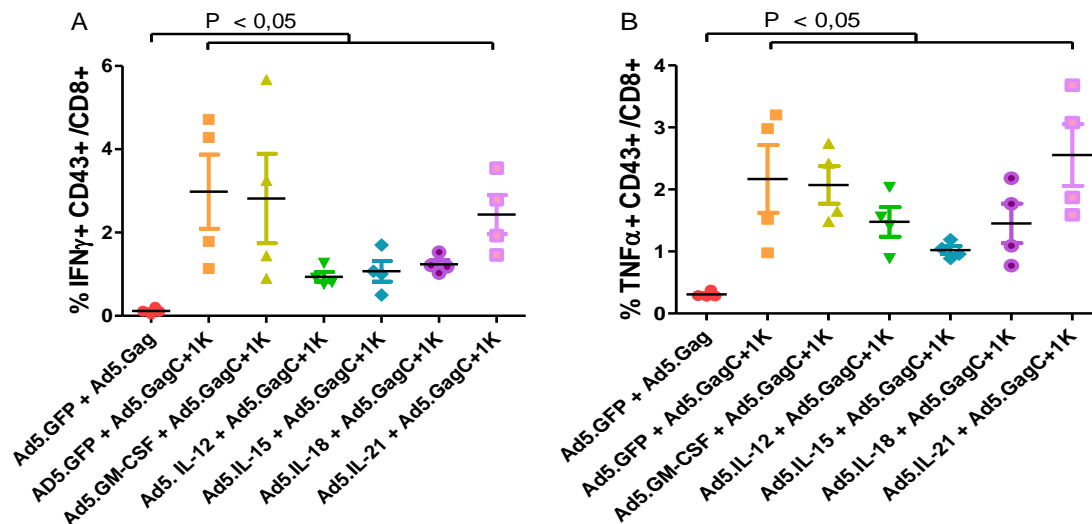


Abb. 4.12: Einfluss der Zytokin-Koexpression auf den Anteil IFN- γ - und TNF- α -produzierender Milzzellen

C57BL/6 Mäuse wurden mit je 1×10^9 VP Gag- bzw. GagC+1K-kodierenden Ad5-Vektoren sowie Ad5-basierenden Vektoren, welche die Th1-Zytokine GM-CSF, IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21 sowie GFP exprimieren, nach einem Prime-Boost-Schema im Abstand von 3 Wochen durch plan-tare Injektionen in die Hinterpfoten koimmunisiert. 14 Tage nach der Boost-Immunisierung wurden Milzzellen nach Restimulation mit FV-Peptid durchflusszytometrisch charakterisiert und der Prozentsatz IFN- γ (A)- bzw. TNF- α (B)-produzierender aktivierter Zellen an der Gesamtheit aller CD8 $^+$ CTL ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte per One-Way-ANOVA (Analysis of Variance) mit Student-Newman-Keuls-Test.

Zur Untersuchung einer immunologischen Relevanz der erhöhten GzmB-Werte wurde ein Schutzexperiment mit hochsuszeptiblen CB6F1-Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere durch eine Prime-Boost-Impfung im Abstand von 3 Wochen mit je 1×10^9 VP Ad5.GagC+1K und Ad5.GFP bzw. Ad5.IL-15 immunisiert. Weitere 3 Wochen später erfolgte eine Belastungsinfektion mit je 2000 SFFU FV-B, worauf sich 21 d p.i. die immunzytochemische Analyse anschloss. Ad5.C1+K-geimpfte Tiere zeigten eine deutliche Reduktion der Viruslast im Vergleich zu unvakzinierten Kontrolltieren. Eine Koexpression von IL-15 führte jedoch nicht zu einem signifikant besseren Schutz gegenüber der alleinigen Immunisierung mit Ad5.GagC+1K (s. Abb. 4.13).

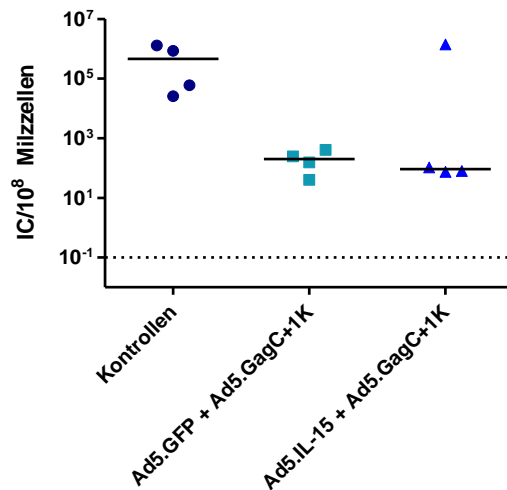


Abb. 4.13: Einfluss der IL15-Koexpression auf den Impferfolg in CB6F1-Mäusen

Hochsuszeptible CB6F1-Mäuse wurden nach einem Prime-Boost-Schema im Abstand von 3 Wochen mit je 1×10^9 VP Ad5.GagC+1K und Ad5.GFP oder einem IL-15-kodierenden Ad5-Vektor immunisiert. Weitere 3 Wochen später erfolgte die intravenöse Belastungsinfektion mit 2 000 SFFU FV-B/Maus. 21 d p.i. wurden Milzzellen entnommen und die Viruslast im IC-Assay analysiert. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar. Die statistische Auswertung erfolgte per One-Way-ANOVA (Analysis of Variance) mit Student-Newman-Keuls-Test ($P > 0,05$).

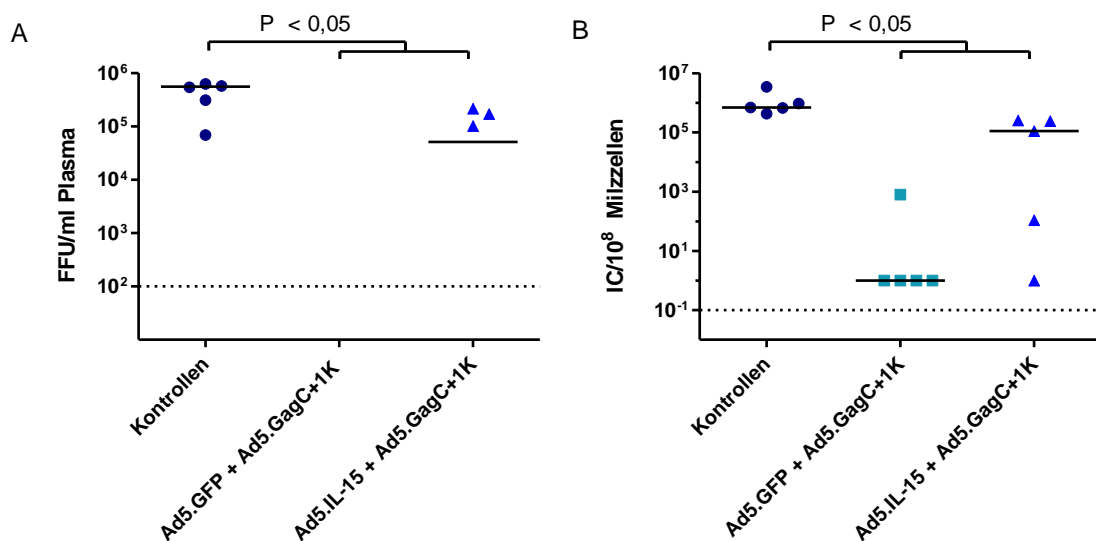


Abb. 4.14: Viruslast Ad5.GagC+1K/Ad5.IL15-vakzinierter CB6F1-Mäuse

CB6F1-Mäuse wurden zweimal im Abstand von 3 Wochen mit plantaren Injektionen in die Hinterpfoten mit je 1×10^9 VP Ad5.GagC+1K und Ad5.GFP bzw. Ad5.IL15 koimmunisiert. 21 Tage nach der Boost-Immunisierung wurden die Tiere intravenös mit 5 000 SFFU FV-B infiziert. (A) Die Plasmaviruslast wurde 10 d p.i. im Virämie-Assay bestimmt. (B) 21 d p.i. wurden im IC-Assay die Viruslast in Milzzellen ermittelt. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze dar. Die statistische Auswertung erfolgte per One-Way-ANOVA (Analysis of Variance) mit Student-Newman-Keuls-Test.

Auch in einer Hochdosis-Belastungsinfektion (5 000 SFFU/Maus) ergab sich keine additive Schutzwirkung bei IL-15-Koexpression (s. Abb. 4.14), es zeigte sich jedoch in beiden Impfgruppen eine signifikant reduzierte Viruslast gegenüber den unvakzinierten Kontrolltieren. Die IL-15-Koadministration bewirkte allerdings eine geringere Reduktion der Viruslast gegenüber den nur mit Ad5.GagC+1K und Ad5-GFP geimpften Kontrolltieren.

5 Diskussion

Im Rahmen von Forschungsanstrengungen im Bereich der Impfstoffentwicklung gegen humane Retroviren hat sich in den vergangenen Jahren immer mehr herauskristallisiert, dass sowohl eine robuste Antikörperantwort als auch eine suffiziente zelluläre Immunreaktion vonnöten ist, um einen vollständigen Schutz vor einer chronischen Infektion zu gewährleisten und damit ein Fortschreiten zu virusassoziierten, häufig letalen Folgestadien wie AIDS zu verhindern (International AIDS Vaccine Initiative, 2008; Dittmer, U. et al., 1999a; P. Sanou, M., 2012).

Die RV144-Studie lieferte im Jahr 2009 als erste große Phase III-Studie ermutigende Ergebnisse für die Entwicklung eines HIV-Impfstoffs. Nach Prime-Boost-Vakzinierung mit einem rekombinanten Kanarienvectoren, der die HIV-1-Gene *Envelope* (Env), *Group-specific Antigen* (Gag) und *Protease* (Pro) exprimiert sowie einem gp120-Subunit-Impfstoff (Env) konnte für einige Probanden mit geringerem Infektionsrisiko ein leichter Impfschutz gegen HIV nachgewiesen werden (Rerks-Ngarm, S. et al., 2009). Der jüngst erfolgte Abbruch der multizentrischen HVTN 505-Studie (Prime-Boost-Immunisierung: DNA-Plasmid mit Gag/Pol/Env/Nef-Sequenzen und Ad5-Vektor mit Gag/Pol/Env-Sequenzen multipler HIV-1-Stämme) aufgrund mangelnder Wirksamkeit (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2013) zeigt jedoch, dass weiterhin ein erheblicher Verbesserungsbedarf bei antiretroviralen Vakzinen besteht.

In verschiedenen Tiermodellen haben sich adenovirale Vektoren als geeignet für die Impfung gegen Retroviren erwiesen, so z.B. in nicht-humanen Primaten (Shiver, J. W.; Emini, E. A., 2004). Auch im Mausmodell wurden sie bereits zur Evaluation von Impfungen gegen das retrovirale FV etabliert (Bayer, W. et al., 2008). Einen vollständigen Schutz geimpfter Tiere im murinen Friend-Virus-Modell konnte jedoch bislang lediglich lebend-attenuiertes F-MuLV hervorrufen (Dittmer, U. et al., 1999a, Dittmer, U. et al., 1998). Eine Attenuierung von HIV wird jedoch aufgrund relevanter Risiken nicht als sicher angesehen (Whitney, J. B.; Ruprecht, R. M., 2004). Die insuffiziente Schutzwirkung adenoviraler Impfvektoren im Friend-Virus-Modell könnte unter anderem auf eine unzureichend starke Antwort CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen zurückzuführen

sein (Bayer, W. et al., 2008), da diese maßgeblich an einer dauerhaften Beseitigung viraler Infektionen beteiligt sind. Im Zuge dieser Arbeit wurden daher verschiedene Methoden zur Verbesserung dieses Teils der zellulären Immunität untersucht.

Bisher konnte nur in der sogenannten *Leader-Region* des Gag-Polyproteins ein CD8⁺ CTL-Epitop (GagL₈₅₋₉₃) nachgewiesen werden (Chen, W. et al., 1996). Dieses konnte jedoch in Vakzinierungsexperimenten mit adenoviralen Vektoren keine Induktion von CD8⁺ CTLs und keinen Schutz der immunisierten Tiere bewirken (Bayer, W. et al., 2008). Daher wurde in dieser Arbeit die noch ausstehende Pol-Sequenz des F-MuLV auf seine Fähigkeit eine CD8⁺ T-Zell-Antwort zu generieren und damit indirekt auf das Vorliegen weiterer CTL-Epitope untersucht. Von einer Immunisierung mit Pol-exprimierenden Vektoren erhofften wir uns eine Verbesserung des Impfschutzes, die Kombination mit verbesserten Gag-exprimierenden Vektoren hätte zudem als Multiepitop-Vakzine verwendet werden können. Doch auch nach erfolgreicher Integration der Pol-Sequenz in einen adenoviralen Vektor und nachweisbarer Expression *in vitro* konnte die rekombinante Vakzine in keinem der immunisierten Mausstämme unterschiedlichen Haplotyps eine signifikante Schutzwirkung gegenüber ungeimpften Kontrolltieren bewirken. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das exprimierte Pol-Protein des F-MuLV keine relevanten CTL-Epitope enthält.

Einen Grund für die ungenügende Induktion einer CD8⁺ CTL-Antwort nach Immunisierungen mit FV-Gag-kodierenden Vektoren könnte die mangelhafte Prozessierung des immundominanten GagL₈₅₋₉₃-Epitops darstellen. Eine unzureichende proteasomale Degradierung viraler Proteine kann eine verminderte Präsentation der Peptide bedingen und so zu einer Verringerung der gegen das Virus gerichteten Immunantwort führen. In einigen Publikationen wurden basische Aminosäuren als vorteilhaft für die Antigenprozessierung beschrieben (Pamer, E.; Cresswell, P., 1998), insbesondere unmittelbar anschließend an den Carboxyterminus des Epitops, wohingegen aromatische Reste für eine niedrigere Immunogenität verantwortlich gemacht werden. In Immunisierungsexperimenten mit HBV-Epitop-Konstrukten, deren C-terminal flankierende Aminosäurereste modifiziert worden waren, konnte die Bedeutung dieser Sequenzen für die Immunogenität von CTL-Epitopen unterstrichen werden, was von den Autoren auf eine verbesserte Interaktion mit dem Proteasom zu-

rückgeführt wurde (Livingston, B. D. et al., 2001). Dieser Erkenntnis Rechnung tragend wurde in der vorliegenden Arbeit der flankierende aromatische Tyrosin- durch einen basischen Lysinrest am C-Terminus des Gag_{L85-93}-Epitops substituiert. Versuche mit dem anschließend mit dieser modifizierten GagL-Sequenz konstruierten adenoviralen Vektor (Ad5.GagC+1K) ließen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine bessere Antigenprozessierung gegenüber dem unmodifizierten Ad5.Gag-Vektor vermuten. Im Belastungsexperiment resultierte daraus eine signifikant verbesserte Schutzwirkung, so wurde die Viruslast im Plasma Ad5.GagC+1K-geimpfter Mäuse im Virämie-Assay bis unter die Nachweisgrenze und die Zahl infizierter Milzzellen um mehr als drei Log-Stufen gesenkt (s. Abb. 4.9).

Eine Erklärung für diese Beobachtung sowie die Diskrepanz zwischen den guten CTL-Antworten in der natürlichen Infektion (Zelinskyy, G. et al., 2006) und den niedrigen CTL-Zahlen bei Vakzinierungen mit Gag-kodierenden adenoviralen Vektoren (Bayer, W., et al., 2008) könnte das Konzept der Immundominanz liefern. Diese ist eng verknüpft mit der präsentierten Menge eines Epitops. Bei gleichzeitigem Vorhandensein mehrerer Epitope ist demnach die Balance zwischen den verschiedenen Epitopen entscheidend für die relative Stärke der einzelnen CTL-Antworten (Sette, A.; Fikes, J., 2003). Maßgeblich für die Menge an präsentierten Epitopen ist die Effizienz der Prozessierung viraler Proteine. Hierbei sind folgende Mechanismen entscheidend: die Degradierung von Antigenen durch das Proteasom, die Affinität der Fremdproteinfragmente zum Transporter TAP (Transporter assoziiert mit der Antigenprozessierung) und deren Trimmung durch Aminopeptidasen im Endoplasmatischen Retikulum. Eine weitere wichtige Determinante ist die Bindungsaffinität der so produzierten Peptide zu den MHC-Molekülen (York, I. A.; Rock, K. L., 1996; Tenzer, S. et al., 2009; Yewdell, J. W., 2006). Während das Gag_{L85-93}-Epitop in der natürlichen Infektion ohne nennenswerte Konkurrenz anderer Epitope die Ausbildung Gag_{L85-93}-spezifischer CD8⁺ CTLs bewirkt, könnte es in der kompetitiven Umgebung der starken adenoviralen Epitope des Impfvektors zu einer Immundominanz der vektoreigenen adenoviralen Epitopen gekommen sein. Dies könnte die Ausbildung einer robusten CTL-Antwort gegen Gag_{L85-93} verhindert haben. Eine ähnliche Unterdrückung der Immunantwort gegen transgene Epitope durch vektoreigene adenovirale Epitope wurde bereits beschrie-

ben (Kron, M. W. et al., 2011; Nielsen, M. et al., 2005). Durch die verbesserte Prozessierung von GagL₈₅₋₉₃ könnte dieses jedoch gegenüber den adenoviralen Epitopen verstärkt präsentiert worden sein und dadurch seine Stellung in der Immundominanzhierarchie verbessert haben.

Die Immundominanz scheint auch bei der Generierung von CTL-Antworten gegen HIV eine bedeutende Rolle zu spielen, wobei auch hier die Prozessierung der Antigene eine entscheidende Determinante für die CTL-Induktion zu sein scheint. Tenzer et al. konnten zeigen, dass insbesondere die proteasomale Aufbereitung der Antigene hierfür ausschlaggebend ist (Tenzer, S. et al., 2009). Für die Entwicklung von Impfstoffen ist dies von besonderer Relevanz: Zum einen scheint nur durch den Einschluss multipler, hochkonservierter Epitope eine ausreichende Schutzwirkung von CTL-Impfstoffen erreichbar zu sein (P. Sanou, M., 2012). Zum anderen ist für eine solche Multiepitop-Vakzine eine komplexe Ausbalancierung des Ertrags der Epitopprozessierung entscheidend, um die Immundominanz auszuhebeln und eine breit angelegte, multispezifische Immunantwort zu generieren (Sette, A.; Fikes, J., 2003). Darüber hinaus konnten Daten aus Experimenten mit HIV-Epitopen zeigen, dass auch bei humanen Retroviren die Epitop-flankierenden Sequenzen von maßgeblicher Bedeutung für eine effiziente Prozessierung und Präsentation von Epitopen sind (Le Gall, S. et al., 2007; Bergmann, C. C. et al., 1996). Durch die in dieser Arbeit beschriebene Modifikation der Impfsequenz als Methode zur Verbesserung der Prozessierungseffizienz könnte somit auch eine Optimierung von HIV-Vakzinen erreicht werden.

Durch die Immunisierung mit Ad5.GagC+1K konnte eine Kontrolle der akuten Infektion mit Viruslasten im Blut unter der Nachweisgrenze des Virämie-Assays und damit ein Schutz hochsuszeptibler Mäuse vor einer letalen Erythroleukämie erreicht werden. Die Tatsache, dass trotz der Induktion einer vergleichsweise hohen Zahl spezifischer CD8⁺ CTLs keine vollständige Eliminierung von FV erreicht wurde, deutet darauf hin, dass mit einer reinen Verbesserung der CD8⁺ CTL-Antwort keine sterile Immunität erreichbar ist. So konnte in Folgeexperimenten auch durch eine deutlich gesteigerte Zahl Epitop-spezifischer CD8⁺ CTL keine weitere Verbesserung des Impfschutzes erreicht werden. Der eingesetzte Ad5.TxnGagL-Vektor, welcher für ein Fusionsprotein aus GagL₈₅₋₉₃ und Thioredoxin kodiert, konnte den Anteil aktivierter, FV-

spezifischer zytotoxischer T-Zellen auf bis zu 10% gegenüber etwa 1% nach Immunisierung mit Ad5.GagC+1K erhöhen. Eine weitere Reduktion der Viruslast in den Milzen infizierter Mäuse blieb jedoch aus. Auch in SIV-Studien konnte kein klarer Zusammenhang zwischen der Anzahl induzierter Epitop-spezifischer CD8⁺ CTL und der Qualität des Impfschutzes hergestellt werden (Robinson, H. L.; Amara, R. R., 2005).

Schutzexperimente mit attenuiertem F-MuLV haben bereits angedeutet, dass für einen vollständigen Schutz komplexe Immunantworten nötig sind (Dittmer, U.; Hasenkrug, K. J., 2001). Insbesondere neutralisierende Antikörper, welche initial die effektive Viruslast reduzieren und so der zellmedierten Immunität Zeit verschaffen sowie T-Helferzellen, die neben der Koaktivierung anderer Immunzellen im Infektionsverlauf auch direkte antiretrovirale Funktionen wahrnehmen, könnten gemeinsam mit einer robusten CD8⁺ CTL-Antwort von entscheidender Bedeutung sein, um eine retrovirale Infektion dauerhaft zu beseitigen (Iwashiro, M. et al., 2001; Dittmer, U. et al., 1999b). Daten aus Experimenten mit nicht-humanen Primaten und HIV-Infizierten legen nahe, dass diese Komponenten des Immunsystems auch für einen HIV-Impfstoff von herausragender Bedeutung sind (Poropatich, K.; Sullivan, D. J., 2011).

Einen weiteren Grund für die inkomplette Eliminierung von FV könnte die Infektion ruhender B-Zellen darstellen. Diese werden vom Virus als Reservoir genutzt und sind so zytotoxischen T-Zellen nicht mehr zugänglich (Hasenkrug, K. J. et al., 1998a; Dittmer, U.; Hasenkrug, K. J., 2001). Möglicherweise verhindert die effektive Reduktion der FV-Last durch eine komplexere Immunantwort in der Frühphase der Infektion bei der Vakzinierung mit attenuiertem F-MuLV eine solche Reservoir-Bildung. So könnte die unzureichende Stimulation weiterer Komponenten der Immunantwort durch die in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren, insbesondere das Fehlen einer suffizienten Antwort neutralisierender Antikörper und von CD4⁺ T-Zellen, die Bildung dieses Reservoirs und damit eine dauerhafte Infektion begünstigt haben (Hasenkrug, K. J. et al., 1998a; Hasenkrug, K. J.; Dittmer, U., 2000). Eine Veränderung des GagL₈₅₋₉₃-Epitops im Sinne einer Escape-Mutation ist dagegen nicht als Ursache der mangelnden Viruselimination anzunehmen, da die Gag-Sequenz ausreichend konserviert zu sein scheint und sich FV auch nach persis-

tierenden Infektionen als gleichermaßen virulent erwiesen hat (Hasenkrug, K. J. et al., 1998a).

Darüber hinaus konnte in Experimenten mit Makaken gezeigt werden, dass nicht-replizierende, als reine T-Zellvakzine konzipierte Vektoren (DNA/Ad5-Impfung) hauptsächlich die Ausbildung einer Population von zentralen CD8⁺ Gedächtniszellen induzieren. Diese zentralen CD8⁺ Gedächtniszellen bewirkten nach rektaler Infektion die Eindämmung der Virämie, eine dauerhafte Infektion konnte jedoch nicht verhindert werden, vermutlich weil SIV in der Latenzzeit zwischen der Infektion und der Ausbildung einer Effektorzellpopulation bereits eine persistierende Infektion etablieren konnte (Hansen, S. G. et al., 2011). Für eine komplette Beseitigung von SIV war offensichtlich eine zum Infektionszeitpunkt bereits vorhandene CD8⁺ Effektor-Gedächtniszellpopulation vonnöten, welche aufgrund der Persistenz viraler Antigene besser durch replizierende Vektoren (in diesem Fall durch einen CMV-Vektor) induziert werden kann (Robinson, H. L.; Amara, R. R., 2005). Diese Erkenntnisse könnten erklären, warum bei der Impfung mit replikationsinkompetenten Ad5.C+1K-Vektoren trotz eines negativen Virämie-Assays in den Milzen geimpfter Mäuse noch FV nachweisbar war. Allerdings wurden in dieser Arbeit die CD8⁺ Zellen nicht mittels Gedächtniszellmarkern weitergehend phänotypisiert und angesichts des zu kurzen Beobachtungszeitraums kann eine komplette Eliminierung von FV im Verlauf nicht ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Verbesserung der CD8⁺ Immunantwort erfolgte eine Koapplikation von Zytokin-exprimierenden Vektoren. Die Koexpression von T_h1-Zytokinen wie GM-CSF, IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21 hatte bereits in Peptid- und DNA-Immunisierungen eine verbesserte CTL-Antwort und zusätzliche Sekretion weiterer T_h1-Zytokine bewirkt (Ahlers, J. D., 2001; Bolesta, E. et al., 2006; Billaut-Mulot, O. et al., 2001). Eine Koapplikation Zytokin-kodierender Ad5-Vektoren mit einem adenoviralen Vektor, der die Env- und Gag-Sequenzen des F-MuLV kodierte, zeigte jedoch im FV-Modell keinen zusätzlichen Schutz (Bayer, W. et al., 2008). Dies war vermutlich unter anderem darauf zurückzuführen, dass die verwendeten Ad5.Env- und Ad5.Gag-Vektoren nicht in der Lage waren eine FV-spezifische CD8⁺ CTL-Antwort zu generieren. Diese war aber durch die Modifikation der Gag-Sequenz deutlich verbessert worden, sodass wir uns von einer gemeinsamen Expression der Zytokine und der GagC+1K-

Sequenz einen additiven Effekt auf die Antwort $CD8^+$ zytotoxischer T-Zellen erhofften. Die Kombination von Zytokin-kodierenden adenoviralen Vektoren mit Ad5.GagC+1K führte allerdings nicht zu einer weiteren Zunahme der Epi-top-spezifischen CTL-Antwort vakzinierter Mäuse. Auch der signifikant erhöhte Anteil GzmB-positiver, aktivierter Milzzellen bei Koimmunisierung mit Ad5.IL-15 im Vergleich zur alleinigen Immunisierung mit Ad5.GagC+1K konnte im Belastungsexperiment keine zusätzliche Schutz bewirken, obwohl GzmB als wichtiger Bestandteil der antiretroviralen Immunabwehr im FV-Modell beschrieben wurde (Zelinskyy, G. et al., 2004). Angesichts der geringen $IFN-\gamma$ - und $TNF-\alpha$ -Werte sowie des niedrigen Anteils FV-spezifischer CTLs und der schlechten Schutzwirkung sprechen die erhöhten GzmB-Werte nach der zusätzlichen Expression von IL-15 für eine unspezifische Immunreaktion. Die Diskrepanz zwischen den positiven Ergebnissen bei DNA- und Peptidimmunisierungen und den enttäuschenden Resultaten bei Vakzinierungen mit adenoviralen Vektoren könnte der Tatsache geschuldet sein, dass adenovirale Vektoren im Gegensatz zu DNA- und Peptidimpfstoffen bereits selbst eine hohe Immunogenität aufweisen (Kay, M. A. et al., 2001). Ein zusätzlicher Stimulus durch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen könnte daher für die Induktion einer Immunantwort unerheblich sein oder die komplexen Interaktionen der beteiligten Zelltypen und Mechanismen womöglich beeinträchtigen.

Vakzinierungen mit attenuiertem F-MuLV haben bereits angedeutet, dass ein bestmöglicher Schutz gegen das Friend Virus durch eine Imitation und Optimierung der natürlichen Immunantwort erreichbar sein könnte. Die in dieser Arbeit präsentierten Ad5.GagC+1K-Vektoren konnten eine robuste $CD8^+$ CTL-Antwort hervorrufen und in suszeptiblen Mäusen ein Fortschreiten zu FV-induzierten, letalen Folgeerkrankungen verhindern. In der Vergangenheit konnten adenovirale Vektoren im Friend-Virus-Modell bereits durch eine kombinierte Expression und direkte Präsentation von FV-Proteinen eine starke $CD4^+$ T-Zell- und Antikörperantwort induzierten und dabei einen signifikant verbesserten Schutz suszeptibler Mäusen gewährleisten (Bayer, W. et al., 2010). Diese beiden Komponenten der antiretroviralen Immunantwort konnten zudem durch eine Koexpression bestimmter Interferon-I-Subtypen weiter optimiert werden (Bayer, W. et al., 2011). Durch eine Kombination dieser Vakzi-

nierungsstrategien mit dem hier vorgestellten Ad5.GagC+1K-Vektor könnte eine sterile Immunität und damit ein vollständiger Schutz susceptibler Tiere mit einer kompletten Beseitigung der Retroviren durch einen sicheren Impfstoff in greifbare Nähe gerückt sein. Die gewonnenen Erkenntnisse zur Optimierung des Immunisierungserfolges mit adenoviralen Vektoren ließen sich trotz der bekannten Restriktionen des Friend-Virus-Modells prinzipiell auch auf humanpathogene Viren wie HIV übertragen. Sie könnten uns einen Schritt näher an das seit langem unerreichte Ziel führen: einen sicheren und effektiven Impfstoff gegen HIV und andere retrovirale Infektionserreger.

6 Zusammenfassung

Die Antwort $CD8^+$ zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) stellt einen wesentlichen Bestandteil der antiretroviralen Immunität dar, denn sie ermöglicht eine effektive Bekämpfung intrazellulärer Erreger. Ein Impfstoff gegen Retroviren muss daher neben einer guten Antikörper- und T-Helferzell-Antwort auch diesen Teil der zellulären Immunität induzieren. In der Vergangenheit ist es bislang nicht gelungen, einen effektiven und zugleich unbedenklichen Impfstoff gegen den retroviralen Friend-Virus-Komplex zu entwickeln. Ursächlich dafür war unter anderem die insuffiziente Generierung einer $CD8^+$ CTL-Antwort durch die verwendeten Vakzine.

In dieser Arbeit wurden daher verschiedene Methoden zur Verbesserung der $CD8^+$ CTL-Antwort evaluiert. Zur Identifikation möglicher $CD8^+$ CTL-Epitope wurde die bislang noch nicht untersuchte FV-Sequenz *Pol* in einen adenoviralen Vektor integriert. Dieser zeigte jedoch im Vakzinierungsexperiment keine Schutzwirkung, da die *Pol*-Sequenz vermutlich keine relevanten Epitope enthält. In einem weiteren Ansatz wurde bei der *GagL₈₅₋₉₃*-Sequenz, die zuvor keine messbare CTL-Antwort induziert hatte, durch die Modifikation der kodierenden Sequenz ein Aminosäureaustausch bewirkt. In einen adenoviralen Vektor als Transgen eingeführt sollte so eine Verbesserung der Antigen-Prozessierung erreicht werden. Mit diesem Vektor konnte sowohl die Immunantwort als auch die Schutzwirkung signifikant verbessert werden. Eine Koapplikation der modifizierten *GagL*-Vakzine und von Vektoren, die ausgewählte Th_1 -Zytokine zur Verbesserung der zellmedierten Immunantwort exprimierten, konnte den Impfschutz allerdings nicht weiter verbessern.

Die Ergebnisse der Arbeit unterstreichen nochmals die Bedeutung zytotoxischer T-Zellen für den Impferfolg im Friend-Virus-Modell und zeigen Methoden auf, mit denen die CTL-Antwort moduliert werden kann. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten auch der Optimierung von Impfstoffen gegen humanpathogene Retroviren zugutekommen.

7 Literaturverzeichnis

1. Ahlers, J. D. (2001):
Mechanisms of cytokine synergy essential for vaccine protection against viral challenge.
International Immunology 13, 897–908.
2. Akkina, R. (2013):
New generation humanized mice for virus research: Comparative aspects and future prospects.
Virology 435, 14–28.
3. Altfeld, M.; Rosenberg, E. S. (2000):
The role of CD4(+) T helper cells in the cytotoxic T lymphocyte response to HIV-1.
Curr. Opin. Immunol 12, 375–380.
4. Baltimore, D. (1970):
RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses.
Nature 226, 1209–1211.
5. Bayer, W.; Lietz, R.; Ontikatz, T.; Johrden, L.; Tenbusch, M.; Nabi, G. et al. (2011):
Improved vaccine protection against retrovirus infection after co-administration of adenoviral vectors encoding viral antigens and type I interferon subtypes.
Retrovirology 8, 75.
6. Bayer, W.; Schimmer, S.; Hoffmann, D.; Dittmer, U.; Wildner, O. (2008):
Evaluation of the Friend Virus model for the development of improved adenovirus-vectored anti-retroviral vaccination strategies.
Vaccine 26, 716–726.
7. Bayer, W.; Tenbusch, M.; Lietz, R.; Johrden, L.; Schimmer, S.; Uberla, K. et al. (2010):
Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection.
J. Virol 84, 1967–1976.
8. Berges, B. K.; Rowan, M. R. (2011):
The utility of the new generation of humanized mice to study HIV-1 infection: transmission, prevention, pathogenesis, and treatment.
Retrovirology 8, 65.
9. Bergmann, C. C.; Yao, Q.; Ho, C. K.; Buckwold, S. L. (1996):
Flanking residues alter antigenicity and immunogenicity of multi-unit CTL epitopes.
J. Immunol. 157, 3242–3249.

10. Berzofsky, J. A.; Ahlers, J. D.; Belyakov, I. M. (2001):
Strategies for designing and optimizing new generation vaccines.
Nat. Rev. Immunol. 1, 209–219.
11. Billaut-Mulot, O.; Idziorek, T.; Loyens, M.; Capron, A.; Bahr, G. M. (2001):
Modulation of cellular and humoral immune responses to a multiepitopic HIV-1 DNA vaccine by interleukin-18 DNA immunization/viral protein boost.
Vaccine 19, 2803–2811.
12. Bolesta, E.; Kowalczyk, A.; Wierzbicki, A.; Eppolito, C.; Kaneko, Y.; Takiguchi, M. et al. (2006):
Increased level and longevity of protective immune responses induced by DNA vaccine expressing the HIV-1 Env glycoprotein when combined with IL-21 and IL-15 gene delivery.
J. Immunol. 177, 177–191.
13. Buchbinder, S. P.; Mehrotra, D. V.; Duerr, A.; Fitzgerald, D. W.; Mogg, R.; Li, D. et al. (2008):
Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial.
Lancet 372, 1881–1893.
14. Chen, W.; Qin, H.; Chesebro, B.; Cheever, M. A. (1996):
Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors.
J. Virol. 70, 7773–7782.
15. Clark, S. P.; Mak, T. W. (1983):
Complete nucleotide sequence of an infectious clone of Friend spleen focus-forming provirus: gp55 is an envelope fusion glycoprotein.
Proc Natl Acad Sci U S A 80, 5037–5041.
16. Cock, K. M. de; Jaffe, H. W.; Curran, J. W. (2011):
Reflections on 30 years of AIDS.
Emerging Infect. Dis 17, 1044–1048.
17. Coffin, J. M.; Hughes, S. H.; Varmus, H. E. (1997):
Retroviruses.
Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
18. Constantin, C. M.; Bonney, E. E.; Altman, J. D.; Strickland, O. L. (2002):
Major Histocompatibility Complex (MHC) Tetramer Technology: An Evaluation.
Biological Research For Nursing 4, 115–127.

19. Deeks, S. G.; Walker, B. D. (2007):
Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy.
Immunity 27, 406–416.
20. Dittmer, U.; Brooks, D. M.; Hasenkrug, K. J. (1999a):
Protection against establishment of retroviral persistence by vaccination with a live attenuated virus.
J. Virol 73, 3753–3757.
21. Dittmer, U.; Brooks, D. M.; Hasenkrug, K. J. (1998):
Characterization of a live-attenuated retroviral vaccine demonstrates protection via immune mechanisms.
J. Virol 72, 6554–6558.
22. Dittmer, U.; Hasenkrug, K. J. (2001):
Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections.
Curr. Mol. Med 1, 431–436.
23. Dittmer, U.; He, H.; Messer, R. J.; Schimmer, S.; Olbrich, A. R. M.; Ohlen, C. et al. (2004):
Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection.
Immunity 20, 293–303.
24. Dittmer, U.; Race, B.; Hasenkrug, K. J. (1999b):
Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus.
J. Virol 73, 8435–8440.
25. Dittmer, U.; Werner, T.; Kraft, A. R. M. (2008):
Co-immunization of mice with a retroviral DNA vaccine and GITRL-encoding plasmid augments vaccine-induced protection against retrovirus infection.
Viral Immunol. 21, 459–467.
26. Douek, D. C.; Brenchley, J. M.; Betts, M. R.; Ambrozak, D. R.; Hill, B. J.; Okamoto, Y. et al. (2002):
HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells.
Nature 417, 95–98.
27. Earl, P. L.; Moss, B.; Morrison, R. P.; Wehrly, K.; Nishio, J.; Chesebro, B. (1986):
T-lymphocyte priming and protection against Friend leukemia by vaccinia-retrovirus env gene recombinant.
Science 234, 728–731.

28. Fazekas St Groth, B. de; Landay, A. L. (2008):
Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response?
AIDS 22, 671–683.
29. Feinberg, M. B.; Moore, J. P. (2002):
AIDS vaccine models: Challenging challenge viruses.
Nat. Med. 8, 207–210.
30. Ferrantelli, F.; Rasmussen, R. A.; Buckley, K. A.; Li, P.-L.; Wang, T.; Montefiori, D. C. et al. (2004):
Complete protection of neonatal rhesus macaques against oral exposure to pathogenic simian-human immunodeficiency virus by human anti-HIV monoclonal antibodies.
J. Infect. Dis 189, 2167–2173.
31. Friend, C. (1957):
Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia.
J. Exp. Med 105, 307–318.
32. Girard, M. P.; Osmanov, S. K.; Kieny, M. P. (2006):
A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV).
Vaccine 24, 4062–4081.
33. Giri, M.; Ugen, K. E.; Weiner, D. B. (2004):
DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade.
Clin. Microbiol. Rev 17, 370–389.
34. Gonçalves, D. U.; Proietti, F. A.; Ribas, J. G. R.; Araújo, M. G.; Pinheiro, S. R.; Guedes, A. C. et al. (2010):
Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases.
Clin. Microbiol. Rev 23, 577–589.
35. Gorry, P. R.; Ancuta, P. (2011):
Coreceptors and HIV-1 Pathogenesis.
Curr HIV/AIDS Rep 8, 45–53.
36. Ha, S.-J.; Mueller, S. N.; Wherry, E. J.; Barber, D. L.; Aubert, R. D.; Sharpe, A. H. et al. (2008):
Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection.
Journal of Experimental Medicine 205, 543–555.
37. Hasenkrug, K. J.; Brooks, D. M.; Dittmer, U. (1998a):
Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice.
J. Virol 72, 6559–6564.

38. Hasenkrug, K. J.; Brooks, D. M.; Robertson, M. N.; Srinivas, R. V.; Chesebro, B. (1998b):
Immunoprotective determinants in friend murine leukemia virus envelope protein.
Virology 248, 66–73.
39. Hasenkrug, K. J.; Chesebro, B. (1997):
Immunity to retroviral infection: The Friend virus model.
Proc Natl Acad Sci U S A 94, 7811–7816.
40. Hasenkrug, K. J.; Dittmer, U. (2000):
The role of CD4 and CD8 T cells in recovery and protection from retroviral infection: lessons from the Friend virus model.
Virology 272, 244–249.
41. Hasenkrug, K. J.; Dittmer, U.; Brooks, D. M. (1999):
Requirement for multiple lymphocyte subsets in protection by a live attenuated vaccine against retroviral infection.
Nat. Med. 5, 189–193.
42. Hazenberg, M. D.; Otto, S. A.; van Benthem, B. H. B.; Roos, M. T. L.; Coutinho, R. A.; Lange, J. M. A. et al. (2003):
Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS.
AIDS 17, 1881–1888.
43. He, T. C.; Zhou, S.; da Costa, L. T.; Yu, J.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. (1998):
A simplified system for generating recombinant adenoviruses.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 2509–2514.
44. Heath, W. R.; Carbone, F. R. (2001):
Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance.
Nat. Rev. Immunol. 1, 126–134.
45. Hoatlin, M. E.; Kozak, S. L.; Lilly, F.; Chakraborti, A.; Kozak, C. A.; Kabat, D. (1990):
Activation of erythropoietin receptors by Friend viral gp55 and by erythropoietin and down-modulation by the murine Fv-2r resistance gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 87, 9985–9989.
46. Hunsmann, G.; Schneider, J.; Schulz, A. (1981):
Immunoprevention of Friend virus-induced erythroleukemia by vaccination with viral envelope glycoprotein complexes.
Virology 113, 602–612.
47. Hunter, E.; Swanstrom, R. (1990):
Retrovirus envelope glycoproteins.
Curr Top Microbiol Immunol 157, 187–253.

48. International AIDS Vaccine Initiative (2008):
AIDS vaccine blueprint 2008.
New York, NY: International AIDS Vaccine Initiative.
49. Iwashiro, M.; Peterson, K.; Messer, R. J.; Stromnes, I. M.; Hasenkrug, K. J. (2001):
CD4+ T Cells and Gamma Interferon in the Long-Term Control of Persistent Friend Retrovirus Infection.
Journal of Virology 75, 52–60.
50. Johnson, P. R.; Schnepf, B. C.; Zhang, J.; Connell, M. J.; Greene, S. M.; Yuste, E. et al. (2009):
Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys.
Nat Med 15, 901–906.
51. Kabat, D. (1989):
Molecular biology of Friend viral erythroleukemia.
Curr Top Microbiol Immunol 148, 1–42.
52. Kane, M.; Case, L. K.; Wang, C.; Yurkovetskiy, L.; Dikiy, S.; Golovkina, T. V. (2011):
Innate Immune Sensing of Retroviral Infection via Toll-like Receptor 7 Occurs upon Viral Entry.
Immunity 35, 135–145.
53. Kassu, A.; Marcus, R. A.; D'Souza, M. B.; Kelly-McKnight, E. A.; Golden-Mason, L.; Akkina, R. et al. (2010):
Regulation of Virus-Specific CD4+ T Cell Function by Multiple Costimulatory Receptors during Chronic HIV Infection.
The Journal of Immunology 185, 3007–3018.
54. Kay, M. A.; Glorioso, J. C.; Naldini, L. (2001):
Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics.
Nat. Med. 7, 33–40.
55. Keele, B. F.; van Heuverswyn, F.; Li, Y.; Bailes, E.; Takehisa, J.; Santiago, M. L. et al. (2006):
Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1.
Science 313, 523–526.
56. Keynan, Y.; Card, C. M.; McLaren, P. J.; Dawood, M. R.; Kasper, K.; Fowke, K. R. (2008):
The Role of Regulatory T Cells in Chronic and Acute Viral Infections.
Clin. Infect. Dis 46, 1046–1052.
57. Kim, J. H.; Rerks-Ngarm, S.; Excler, J.-L.; Michael, N. L. (2010):
HIV vaccines: lessons learned and the way forward.
Curr Opin HIV AIDS 5, 428–434.

58. Klenerman, P.; Cerundolo, V.; Dunbar, P. R. (2002):
Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools.
Nat Rev Immunol 2, 263–272.
59. Koff, W. C.; Johnson, P. R.; Watkins, D. I.; Burton, D. R.; Lifson, J. D.;
Hasenkrug, K. J. et al. (2006):
HIV vaccine design: insights from live attenuated SIV vaccines.
Nat Immunol 7, 19–23.
60. Kron, M. W.; Engler, T.; Schmidt, E.; Schirmbeck, R.; Kochanek, S.;
Kreppel, F. (2011):
High-capacity adenoviral vectors circumvent the limitations of $\Delta E1$ and
 $\Delta E1/\Delta E3$ adenovirus vectors to induce multispecific transgene product-
directed CD8 T-cell responses.
J Gene Med 13, 648–657.
61. Kutzler, M. A.; Weiner, D. B. (2008):
DNA vaccines: ready for prime time?
Nat Rev Genet 9, 776–788.
62. Kwong, P. D.; Mascola, J. R.; Nabel, G. J. (2011):
Rational Design of Vaccines to Elicit Broadly Neutralizing Antibodies to
HIV-1.
Cold Spring Harb Perspect Med 1, a007278.
63. Labrijn, A. F.; Poignard, P.; Raja, A.; Zwick, M. B.; Delgado, K.; Franti,
M. et al. (2003):
Access of Antibody Molecules to the Conserved Coreceptor Binding Site
on Glycoprotein gp120 Is Sterically Restricted on Primary Human Immu-
nodeficiency Virus Type 1.
Journal of Virology 77, 10557–10565.
64. Lander, M. R.; Chattopadhyay, S. K. (1984):
A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous
murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic,
xenotropic, and mink cell focus-forming viruses.
J. Virol 52, 695–698.
65. Lavender, K. J.; Pang, W. W.; Messer, R. J.; Duley, A. K.; Race, B.; Phil-
lips, K. et al. (2013):
BLT-humanized C57BL/6 Rag2^{-/-} c^{-/-}CD47^{-/-} mice are resistant to GVHD
and develop B and T cell immunity to HIV infection.
Blood; Vorabveröffentlichung online
66. Le Gall, S.; Stamegna, P.; Walker, B. D. (2007):
Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing.
J. Clin. Invest. 117, 3563–3575.

67. Lemckert, A. A. C.; Sumida, S. M.; Holterman, L.; Vogels, R.; Truitt, D. M.; Lynch, D. M. et al. (2005):
Immunogenicity of Heterologous Prime-Boost Regimens Involving Recombinant Adenovirus Serotype 11 (Ad11) and Ad35 Vaccine Vectors in the Presence of Anti-Ad5 Immunity.
Journal of Virology 79, 9694–9701.
68. Letvin, N. L. (2002):
Strategies for an HIV vaccine.
J. Clin. Invest. 110, 15–27.
69. Li, J.-P.; D'Andrea, A. D.; Lodish, H. F.; Baltimore, D. (1990):
Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor.
Nature 343, 762–764.
70. Livingston, B. D.; Newman, M.; Crimi, C.; McKinney, D.; Chesnut, R.; Sette, A. (2001):
Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines.
Vaccine 19, 4652–4660.
71. Lu, M.; Isogawa, M.; Xu, Y.; Hilken, G. (2005):
Immunization with the Gene Expressing Woodchuck Hepatitis Virus Nucleocapsid Protein Fused to Cytotoxic-T-Lymphocyte-Associated Antigen 4 Leads to Enhanced Specific Immune Responses in Mice and Woodchucks.
Journal of Virology 79, 6368–6376.
72. Margolis, D. M. (2010):
Mechanisms of HIV latency: an emerging picture of complexity.
Curr HIV/AIDS Rep 7, 37–43.
73. Martin, M. P.; Gao, X.; Lee, J.-H.; Nelson, G. W.; Detels, R.; Goedert, J. J. et al. (2002):
Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS.
Nat. Genet 31, 429–434.
74. Maue, A. C.; Waters, W. R.; Palmer, M. V.; Whipple, D. L.; Minion, F. C.; Brown, W. C. et al. (2004):
CD80 and CD86, but not CD154, augment DNA vaccine-induced protection in experimental bovine tuberculosis.
Vaccine 23, 769–779.
75. Mitchell, T. (1993):
Increased hematopoiesis in mice soon after infection by Friend murine leukemia virus.
J. Virol 67, 3665–3670.
76. Miyazawa, M.; Tsuji-Kawahara, S.; Kanari, Y. (2008):
Host genetic factors that control immune responses to retrovirus infec-

tions.

Vaccine 26, 2981–2996.

77. Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U. (2003):
Molekulare Virologie. 2.
Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl.
78. Montefiori, D. C.; Mascola, J. R. (2009):
Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines
and how much do we need?
Current Opinion in HIV and AIDS 4, 347–351.
79. Montefiori, D. C.; Morris, L.; Ferrari, G.; Mascola, J. R. (2007):
Neutralizing and other antiviral antibodies in HIV-1 infection and vaccina-
tion.
Current Opinion in HIV and AIDS 2, 169–176.
80. Murphy, K. P.; Janeway, C.; Travers, P.; Walport, M. (2008):
Janeway's Immunobiology. 7. ed. /.
New York [u.a.]: Garland Science.
81. Nair, S. R.; Zelinskyy, G.; Schimmer, S.; Gerlach, N.; Kassiotis, G.;
Dittmer, U. (2010):
Mechanisms of control of acute Friend virus infection by CD4+ T helper
cells and their functional impairment by regulatory T cells.
J. Gen. Virol 91, 440–451.
82. National Institute of Allergy and Infectious Diseases:
HIV Replication Cycle (2012).
[http://www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/understanding/biology/Pages/hiv
ReplicationCycle.aspx](http://www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/understanding/biology/Pages/hivReplicationCycle.aspx).
83. National Institute of Allergy and Infectious Diseases:
Statement: NIH Discontinues Immunizations in HIV Vaccine Study
(2013).
[http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2013/Pages/HVTN505April
2013.aspx](http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2013/Pages/HVTN505April2013.aspx).
84. Nielsen, M.; Lundegaard, C.; Lund, O.; Keşmir, C. (2005):
The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: in-
sights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage.
Immunogenetics 57, 33–41.
85. Nishigaki, K.; Thompson, D.; Hanson, C.; Yugawa, T.; Ruscetti, S.
(2001):
The Envelope Glycoprotein of Friend Spleen Focus-Forming Virus Cova-
lently Interacts with and Constitutively Activates a Truncated Form of the
Receptor Tyrosine Kinase Stk.
Journal of Virology 75, 7893–7903.
86. Norris, P. J.; Sumaroka, M.; Brander, C.; Moffett, H. F.; Boswell, S. L.;
Nguyen, T. et al. (2001):

- Multiple Effector Functions Mediated by Human Immunodeficiency Virus-Specific CD4⁺ T-Cell Clones.
Journal of Virology 75, 9771–9779.
87. O'Garra, A. (1998):
Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets.
Immunity 8, 275–283.
 88. Ohlen, C. (2002):
CD8⁺ T Cell Tolerance to a Tumor-associated Antigen Is Maintained at the Level of Expansion Rather than Effector Function.
Journal of Experimental Medicine 195, 1407–1418.
 89. P. Sanou, M. (2012):
HIV-1 Vaccine Trials: Evolving Concepts and Designs.
TOAIDJ 6, 274–288.
 90. Pamer, E.; Cresswell, P. (1998):
Mechanisms of MHC Class I-restricted Antigen Processing.
Annu. Rev. Immunol. 16, 323–358.
 91. Pandrea, I. V.; Gautam, R.; Ribeiro, R. M.; Brenchley, J. M.; Butler, I. F.; Pattison, M. et al. (2007):
Acute loss of intestinal CD4⁺ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence.
J. Immunol. 179, 3035–3046.
 92. Perryman, S.; Nishio, J.; Chesebro, B. (1991):
Complete nucleotide sequence of Friend murine leukemia virus, strain FB29.
Nucleic Acids Res 19, 6950.
 93. Poiesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Reitz, M. S.; Kalyanaraman, V. S.; Gallo, R. C. (1981):
Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia.
Nature 294, 268–271.
 94. Poignard, P.; Sabbe, R.; Picchio, G. R.; Wang, M.; Gulizia, R. J.; Katinger, H. et al. (1999):
Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo.
Immunity 10, 431–438.
 95. Poropatich, K.; Sullivan, D. J. (2011):
Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression.
J. Gen. Virol 92, 247–268.
 96. Rerks-Ngarm, S.; Pitisuttithum, P.; Nitayaphan, S.; Kaewkungwal, J.; Chiu, J.; Paris, R. et al. (2009):

- Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand.
N. Engl. J. Med 361, 2209–2220.
97. Robinson, H. L.; Amara, R. R. (2005):
T cell vaccines for microbial infections.
Nat Med 11, S25.
 98. Rous, P. (1910):
A transmissible avian neoplasm. (sarcoma of the common fowl.).
J. Exp. Med 12, 696–705.
 99. Rutjens, E.; Balla-Jhagjhoorsingh, S.; Verschoor, E.; Bogers, W.; Koopman, G.; Heeney, J. (2003):
Lentivirus infections and mechanisms of disease resistance in chimpanzees.
Front. Biosci 8, d1134-45.
 100. Ryan, F. P. (2004):
Human endogenous retroviruses in health and disease: a symbiotic perspective.
J R Soc Med 97, 560–565.
 101. Santiago, M. L.; Range, F.; Keele, B. F.; Li, Y.; Bailes, E.; Bibollet-Ruche, F. et al. (2005):
Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2.
J. Virol 79, 12515–12527.
 102. Schepers, K.; Toebes, M.; Sotthewes, G.; Vyth-Dreese, F. A.; Dellemijn, T. A. M.; Melief, C. J. M. et al. (2002):
Differential kinetics of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell responses in the regression of retrovirus-induced sarcomas.
J. Immunol. 169, 3191–3199.
 103. Sette, A.; Fikes, J. (2003):
Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery.
Current Opinion in Immunology 15, 461–470.
 104. Shedlock, D. J. (2003):
Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory.
Science 300, 337–339.
 105. Shiver, J. W.; Emini, E. A. (2004):
Recent Advances in the Development of HIV-1 Vaccines Using Replication-Incompetent Adenovirus Vectors.

- Annu. Rev. Med. 55, 355–372.
106. Simon, V.; Ho, D. D.; Abdool Karim, Q. (2006):
HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment.
Lancet 368, 489–504.
 107. Sodora, D. L.; Silvestri, G. (2008):
Immune activation and AIDS pathogenesis.
AIDS 22, 439–446.
 108. Sousa, A. E.; Carneiro, J.; Meier-Schellersheim, M.; Grossman, Z.; Victorino, R. M. M. (2002):
CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load.
J. Immunol 169, 3400–3406.
 109. Stevenson, M. (2003):
HIV-1 pathogenesis.
Nat. Med 9, 853–860.
 110. Temin, H. M.; Mizutani, S. (1970):
RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.
Nature 226, 1211–1213.
 111. Tenzer, S.; Wee, E.; Burgevin, A.; Stewart-Jones, G.; Friis, L.; Lamberth, K. et al. (2009):
Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance.
Nat Immunol 10, 636–646.
 112. UNAIDS:
Estimated HIV Prevalence 2011 (2012a).
<http://www.unaids.org/en/dataanalysis/datatools/aidsinfo/>.
 113. UNAIDS (2012b):
Global report 2012.
Genf: UNAIDS.
 114. Vahlne, A. (2009):
A historical reflection on the discovery of human retroviruses.
Retrovirology 6, 40.
 115. Valadas, E.; França, L.; Sousa, S.; Antunes, F. (2009):
20 years of HIV-2 infection in Portugal: trends and changes in epidemiology.
Clin. Infect. Dis 48, 1166–1167.
 116. van Duyne, R.; Pedati, C.; Guendel, I.; Carpio, L.; Kehn-Hall, K.; Saifuddin, M. et al. (2009):
The utilization of humanized mouse models for the study of human retroviral infections.

Retrovirology 6, 76.

117. Vargas, J.; Gusella, G. L.; Najfeld, V.; Klotman, M. E.; Cara, A. (2004): Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 15, 361–372.
118. Watkins, D. I.; Burton, D. R.; Kallas, E. G.; Moore, J. P.; Koff, W. C. (2008): Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat. Med* 14, 617–621.
119. Wensing, A. M. J.; van de Vijver, D. A.; Angarano, G.; Asjö, B.; Balotta, C.; Boeri, E. et al. (2005): Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J. Infect. Dis* 192, 958–966.
120. Whitney, J. B.; Ruprecht, R. M. (2004): Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17, 17–26.
121. Wilson, J. M. (1996): Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N. Engl. J. Med.* 334, 1185–1187.
122. Wonderlich, E.; Leonard, J.; Collins, K. (2011): HIV immune evasion disruption of antigen presentation by the HIV Nef protein. *Adv Virus Res* 80, 103–127.
123. Wu, X.; Yang, Z.-Y.; Li, Y.; Hogerkorp, C.-M.; Schief, W. R.; Seaman, M. S. et al. (2010): Rational Design of Envelope Identifies Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to HIV-1. *Science* 329, 856–861.
124. Xiang, Z. Q.; Yang, Y.; Wilson, J.; ERTL, H. C. (1996): A Replication-Defective Human Adenovirus Recombinant Serves as a Highly Efficacious Vaccine Carrier. *Virology* 219, 220–227.
125. Yewdell, J. W. (2006): Confronting Complexity: Real-World Immunodominance in Antiviral CD8+ T Cell Responses. *Immunity* 25, 533–543.
126. York, I. A.; Rock, K. L. (1996): Antigen Processing and Presentation by the Class I Major Histocompatibility Complex. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 369–396.

127. Zelinskyy, G.; Balkow, S.; Schimmer, S.; Schepers, K.; Simon, M. M.; Dittmer, U. (2004):
Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection.
Virology 330, 365–374.
128. Zelinskyy, G.; Kraft, A. R. M.; Schimmer, S.; Arndt, T.; Dittmer, U. (2006):
Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection.
Eur. J. Immunol. 36, 2658–2670.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A

Ad5

Adenovirus Typ 5

AEC

Aminoethylcarbazol

AIDS

Acquired Immunodeficiency Syndrome

B

BSA

Bovines Serum-Albumin

C

CFSE

Carboxyfluoresceinsuccinimidylester

CMV

Cytomegalievirus

CTL

Zytotoxische T-Lymphozyten

D

d p.i.

Tage nach Belastungsinfektion

DC

Dendritische Zelle

DNA

Desoxyribonukleinsäure

E

Env

Envelope

F

FCS

Fetales Kälberserum

FFU

Focus Forming Units

FITC

Fluoresceinisothiocyanat

F-MuLV

Friend Murine Leukemia Virus

FV

Friend Virus

FVD

Fixable Viability Dye

G

Gag

Gruppenspezifische Antigene

GFP

Grün fluoreszierendes Protein

GM-CSF

Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor

gp

Glykoprotein

GzmB

Granzym B

H

HERV

HIV

HLA

HRP

HTLV

I

i.v.

IC

IFN

Ig

IL

IN

K

kb

kDa

kV

M

MHC

MOI

MuLV

N

nm

O

OD

P

p.i.

PCR

PE

PI

PR

R

RNA

Humane endogene Retroviren

Humanes Immunodefizienzvirus

Humanes Leukozytenantigen

Horseraddish-Peroxidase

Humanes T-lymphotropes Virus

intravenös

infektiöse Zentren

Interferon

Immunglobulin

Interleukin

Integrase

Kilobasen

Kilodalton

Kilovolt

*Major Histocompatibility Complex**Multiplicity Of Infection*

Murines Leukämievirus

Nanometer

optische Dichte

nach Infektion

Polymerase-Kettenreaktion

Phycoerythrin

Propidiumiodid

Protease

Ribonukleinsäure

RPE	R-Phycoerythrin
RT	Reverse Transkriptase
S	
SFFU	<i>Spleen Focus Forming Units</i>
SFFV	<i>Spleen Focus Forming Virus</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
T	
TAP	Transporter assoziiert mit der Anti- genprozessierung
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
V	
VP	virale Partikel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Infektions- und Replikationszyklus von HIV	8
Abb. 1.2: Globale HIV-Prävalenz 2011	10
Abb. 3.1: Versuchsschema bei Analyse der Immunantwort	44
Abb. 3.2: Versuchsschema bei Schutzexperimenten	45
Abb. 3.3: Aufbau und Funktion von MHC-I-Tetrameren	49
Abb. 4.1: Schematische Übersicht des AdEasy™-Systems	50
Abb. 4.2: Expression von pAd5.Pol durch HEK 293T-Zellen im Western Blot ..	52
Abb. 4.3: Viruslast Ad5.Pol-vakzinierter C57BL/6-Mäuse	53
Abb. 4.4: Viruslast Ad5.Pol-vakzinierter CB6F1-Mäuse	54
Abb. 4.5: Viruslast Ad5.Pol-vakzinierter BC3F1-Mäuse	54
Abb. 4.6: Schematische Darstellung des Ad5.GagC+1K-Vektors	56
Abb. 4.7: <i>In vitro</i> -Proliferationsassay	56
Abb. 4.8: Anteil aktivierter Epitop-spezifischer CD8 ⁺ CTL im Blut	
Ad5.GagC+1K-vakzinierter CB6F1-Mäuse	57
Abb. 4.9: Viruslast Ad5.GagC+1K-vakzinierter CB6F1-Mäuse	58
Abb. 4.10: Einfluss der Zytokin-Koexpression auf den Anteil aktivierter Epitop- spezifischer CD8 ⁺ CTL	59
Abb. 4.11: Einfluss der Zytokin-Koexpression auf den Anteil GzmB- produzierender Milzzellen	60
Abb. 4.12: Einfluss der Zytokin-Koexpression auf den Anteil IFN- γ - und TNF- α - produzierender Milzzellen	61
Abb. 4.13: Einfluss der IL15-Koexpression auf den Impferfolg in CB6F1- Mäusen	62
Abb. 4.14: Viruslast Ad5.GagC+1K/Ad5.IL15-vakzinierter CB6F1-Mäuse	62

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genotyp und Suszeptibilität	25
Tabelle 2: Suszeptibilitätsgenotypen der verwendeten Mausstämme	37
Tabelle 3: Zusammensetzung des SDS-PAGE-Gels	41
Tabelle 4: Infektionsdosen verschiedener Mausstämme	45

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Wibke Bayer, für ihre unermüdliche Unterstützung und ihre Geduld. Sie hat einen maßgeblichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit.

Herrn Professor Ulf Dittmer danke ich für die Überlassung des Themas und sein Vertrauen.

Mit Sonja Windmann, Inga Ohs und Sandra Francois habe ich viele gemeinsame Stunden im Labor verbracht, vielen Dank für Eure Hilfe und die tolle Zeit. Ebenso Danke ich Kathrin Gibbert für ihre Hilfe, nicht nur bei den RT-PCRs. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen anderen Teilnehmern des *Internen Retrovirusseminars* für ihre Unterstützung und die gemeinsame Zeit bedanken, bei Anke, Daniela, Gennadiy, Ilseyar, Jara, Kirsten, Nora, Simone und Tanja.

Ein großer Dank gilt meinem Biologielehrer Klaus Levien, der in mir die Begeisterung für die Naturwissenschaften und das rationale Denken geweckt hat.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken und dafür, dass sie mir alle Möglichkeiten im Leben eröffnet haben.

Besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Diana bedanken, die mich sehr unterstützt hat und immer für mich da war.

8.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.